

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**Identificación parcial de principios activos de diez plantas
medicinales del norte de México con actividad biológica contra
bacterias patógenas de aislados clínicos y cepas de referencia**

POR

MARIA DEL CARMEN VEGA MENCHACA

TESIS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Acentuación en Química de Productos Naturales**

Junio 2013

**Identificación parcial de principios activos de diez plantas
medicinales del norte de México con actividad biológica contra
bacterias patógenas de aislados clínicos y cepas de referencia**

POR

MARIA DEL CARMEN VEGA MENCHACA

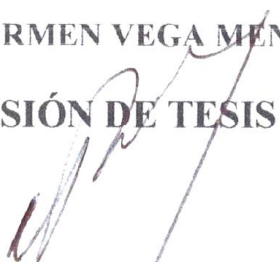
TESIS

**Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Acentuación en Química de Productos Naturales**

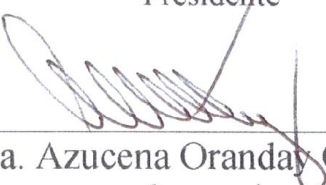
Por

MARIA DEL CARMEN VEGA MENCHACA

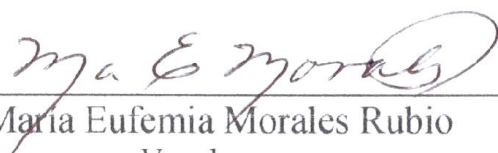
COMISIÓN DE TESIS



Dra. Catalina Rivas Morales
Presidente



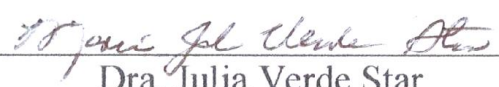
Dra. Azucena Oranday Cardenas
Secretaria



Dra. Maria Eufemia Morales Rubio
Vocal



Dra. María Adriana Núñez González
Vocal



Dra. Julia Verde Star
Vocal

Junio 2013

**Identificación parcial de principios activos de diez plantas
medicinales del norte de México con actividad biológica contra
bacterias patógenas de aislados clínicos y cepas de referencia**

POR

MARIA DEL CARMEN VEGA MENCHACA


TESIS

**Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Acentuación en Química de Productos Naturales**

Por

MARIA DEL CARMEN VEGA MENCHACA

COMISIÓN DE TESIS:



Dra. Catalina Rivas Morales
Director Interno



Dr. Luis Benjamín Serrano Gallardo
Director Externo

Junio 2013

DEDICATORIA

A mi familia

A mi esposo Luis Benjamín Serrano Gallardo.

Gracias por haberme inculcado el amor por la investigación y sobre todo apoyarme en este proyecto y darme palabras de aliento cuando sentía que no podía continuar. Muchas gracias por todo. Te amo.

A mi hijo Luis Benjamín Serrano Vega

Te agradezco infinitamente tu apoyo y comprensión sobre todo por las horas robadas y la angustia provocada por mis constantes viajes, sobre todo gracias hijo por tu ayuda en las traducciones al inglés necesarias en este proyecto. Te amo.

A mi hermana Doris.

Por alentarme día a día a terminar este proyecto. Gracias hermanita te quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Dra Catalina un agradecimiento muy especial por creer en mi, alentarme desinteresadamente en la realización del proyecto, por su valiosa colaboración en el desarrollo del mismo. Le agradezco y admiro por que además de enseñarme un poco de lo mucho que sabe, me enseñó que es más importante la calidad humana que mil libros de ciencia

A mi comité de tesis: Doctoras Julia, Azucena, Adriana y Eufemia agradezco infinitamente sus revisiones en la tesis y artículo sobre todo por enderezar la redacción de los mismos. Gracias por su calidez humana.

Un agradecimiento muy especial al Maestro Sergio por su apoyo y paciencia en la asesoría de las técnicas de cromatografía.

A mis amigas y socias Paty y Janis gracias por darme ánimos y palabras de aliento durante la realización de este proyecto.

En forma muy especial a mi hija académica la QFB Angelita por tu valioso apoyo en la parte técnica y experimental del proyecto, sobre todo por tu amistad.

A la QFB Rosa Elena por su apoyo en la redacción. Gracias por tu amistad.

Agradezco infinitamente a la Bióloga Isabel de la UAAAN por su apoyo en la recolección de las plantas. Gracias Chavelita por todas las marchas etnobotánicas realizadas.

Joaquín y Miguel es difícil la convivencia entre maestros y alumnos pero nuestros viajes a los seminarios y cursos cada semestre se convirtieron en lo más agradable en este difícil camino, es más voy a extrañar estos viajes.

David Gilberto y David Mizael gracias por su apoyo durante la realización de la interesante técnica de bioautografía.

AL M.C Mario Rivera Guillén y la QFB Shanti por su asesoría en la parte estadística de esta tesis.

M.C. Irais mil gracias por tu apoyo en el ensayo de Citotoxicidad con líneas celulares

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

Quiero agradecer a CONACYT por la beca otorgada número 341796

A las Instituciones y Departamentos que me recibieron para la realización y apoyaron en la parte experimental del proyecto de tesis:

Universidad Autónoma de Nuevo León al Proyecto PAICYT CN643-11
Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorios de Fitoquímica y Química Analítica.

Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas,
Laboratorios de Microbiología y de Investigación.

Universidad Autónoma de Coahuila. Centro de Investigación Biomédica de la
Facultad de Medicina, Laboratorio de Etnofarmacología.

INDICE DE CONTENIDO

Contenido	Página No.
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
NOMENCLATURA	xviii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1.- INTRODUCCIÓN	3
3.- Definición del problema y justificación	6
3.- Hipótesis	7
4.- Objetivos	8
4.1 Objetivo General	8
4.2 Objetivos específicos	8
5.- ANTECEDENTES	9
5.1 Generalidades	9
5.2 Selección del material vegetal y preparación de los extractos	10
5.3 Actividad antimicrobiana de las plantas	11
5.4 Resistencia bacteriana	13
5.5 Análisis fitoquímico	14
5.6 Taxonomía de las Plantas estudiadas	17
5.6.1 <i>Leucophyllum frutescens</i>	17
5.6.2 <i>Flourensia cernua</i>	18
5.6.3 <i>Tecoma stans</i>	19

5.6.4 <i>Euphorbia antisyphilitica</i>	20
5.6.5 <i>Loeselia mexicana</i>	21
5.6.6 <i>Acacia farnesiana</i>	22
5.6.7 <i>Tagetes lucida</i>	23
5.6.8 <i>Fouquieria splendens</i>	24
5.6.9 <i>Agave americana</i>	25
5.6. 10 <i>Phoenix dactylifera</i>	26
5.7 Cepas bacterianas: Características fisiológicas y morfológicas	27
5.7.1 Bacterias Gram negativas	27
5.7.1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	27
5.7.1.2 <i>Escherichia coli</i>	28
5.7.2. Bacterias Gram positivas	29
5.7.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	30
5.8 Métodos para evaluar la efectividad antimicrobiana	31
5.8.1 Método de dilución en caldo	31
5.8.2 Método de difusión de agar en disco	32
5.8.3 Método de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	33
5.9 Bioautografía	34
5.10 Identificación microbiana	35
5.11 Toxicidad con el bioensayo de <i>Artemia salina</i>	35
5.12 Citotoxicidad con líneas celulares de mamífero	36
5.13 Cromatografía de gases acoplada a masas	37
6.- MATERIAL Y MÉTODOS	39
6.1 Lugar, área de trabajo y período de estudio	39
6.2 Recolección de material vegetal	39

6.3 Obtención de los extractos metanólicos de las plantas	40
6.4 Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las fracciones activas	41
6.4.1 Activación de las bacterias	41
6.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos que muestren actividad biológica relevante	42
6.4.3 Identificación de las fracciones con actividad antibacteriana mediante la técnica de bioautografía	43
6.4.3.1 Cromatografía en capa delgada de los extractos que mostraron actividad antibacteriana para identificar las fracciones activas	43
6.5 Ensayo de Letalidad con larvas de <i>Artemia salina</i>	44
6.6 Determinación de Citotoxicidad en Cultivo Celular	46
6.7 Análisis de las fracciones por Cromatografía de Gases acoplado a Masas.	47
6.8 Análisis estadístico	48
7.- RESULTADOS	49
7.1 Recolección e identificación del material vegetal de estudio	49
7.2 Rendimiento de los extractos metanólicos	49
7.3 Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las plantas	50
7.4 Actividad antibacteriana	54
7.4.1. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los extractos que mostraron mayor actividad biológica	55
7.5 Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de <i>Artemia salina</i>	58
7.6 Citotoxicidad de los extractos sobre la línea celular VERO	62

7.7 Actividad Antimicrobiana mediante el método de Bioautografía	63
7.8 Bioautografía	64
7.9 Resultados del análisis cromatográfico de <i>L. frutescens</i>	65
8.- DISCUSIÓN	68
9.- CONCLUSIONES	73
10.- BIBLIOGRAFIA	75
 ANEXOS	 86

INDICE DE TABLAS

Tabla No.	Contenido	Página
1	Grupos químicos obtenidos de plantas con actividad antimicrobiana	13
2	Constituyentes bioactivos de algunas plantas con actividad biológica	15
3	Compuestos químicos de algunas plantas con actividad antibacteriana	16
4	Microorganismos utilizados	41
5	Identificación taxonómica de las especies vegetales estudiadas	49
6	Rendimiento de los extractos metanólicos de especies vegetales recolectadas en el semidesierto Chihuahuense	50
7	Actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales en estudio de Norte de México contra cepas bacterianas de referencia ATCC mediante el método de difusión en disco en agar	51
8	Actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales en estudio del Norte de México contra cepas bacterianas de aislados clínicos (AC) mediante el método de difusión en disco en agar	52
9	Actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales que mostraron inhibición sobre <i>S. aureus</i> (AC)	53
10	Actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales que mostraron inhibición sobre <i>E. coli</i> ATCC O157	53

11	Actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales que mostraron inhibición sobre <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 9183	54
12	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos metanólicos de las especies en estudio	57
13	Actividad de los extractos metanólicos sobre la letalidad en nauplios de <i>Artemia salina</i> .	58
14	Bandas obtenidas de la fracción clorofórmica de <i>L. frutescens</i> reveladas a la luz UV y CoCl ₂ eluyente Benceno-Acetona (8:2	64
15	Tiempos de retención (TR), certeza y compuesto probable de los espectros obtenidos del análisis espectroscópico del extracto de <i>L. frutescens</i> .	67

INDICE DE FIGURAS

Figura No.	Contenido	Página
1	<i>Leucophyllum frutescens</i>	17
2	<i>Flourensia cernua</i>	18
3	<i>Tecoma stans</i>	19
4	<i>Euphorbia antisiphilitica</i>	20
5	<i>Loeselia mexicana</i>	21
6	<i>Acacia farnesiana</i>	22
7	<i>Tagetes lucida</i>	23
8	<i>Fouquieria splendens</i>	24
9	<i>Agave americana</i>	25
10	<i>Phoenix dactylifera</i>	26
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Gram y microfotografía electrónica	28
12	<i>Escherichia coli</i> Gram y microfotografía electrónica	29
13	<i>Staphylococcus</i> . fotografía macroscópica y microscópica	31
14	Diagrama de flujo de la extracción metanólica de las especies vegetales.	40

15	Diagrama de flujo actividad bactericida	42
16	Diagrama de flujo para medir la Concentración Mínima Inhibitoria	43
17	Diagrama de la bioautografía	44
18	Diagrama del bioensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i>	45
19	Diagrama de la prueba de citotoxicidad con la línea celular VERO	47
20	Fraccionamiento de la extracción clorofórmica de <i>L. frutescens</i>	63
21	Inhibición sobre <i>S. aureus</i> por bioautografía	64
22	Cromatograma del extracto metanólico de <i>L. frutescens</i>	66

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica No.	Contenido	Página
1	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>L. frutescens</i> sobre <i>S. aureus</i>	55
2	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>T. stans</i> sobre <i>S. aureus</i>	55
3	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>F. splendens</i> sobre <i>S. aureus</i>	56
4	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>T. lucida</i> sobre <i>S. aureus</i> .	56
5	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>E. antisiphylitica</i> sobre <i>S. aureus</i>	56
6	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>T. lucida</i> sobre <i>E. cloacae</i> (referencia)	56
7	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>A. americana</i> sobre <i>E. cloacae</i> (referencia)	56
8	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>F. cernua</i> sobre <i>E. cloacae</i> (referencia)	56
9	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>F. cernua</i> sobre <i>E. coli</i> O157	57
10	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>L. frutescens</i> sobre <i>E. coli</i> O157	57
11	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de <i>L. frutescens</i>	59
12	DL50 de extracto metanólico de <i>L. frutescens</i> sobre <i>A salina</i>	59

13	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de <i>T. stans</i>	59
14	DL50 del extracto metanólico de <i>T. stans</i> sobre <i>A. salina</i>	59
15	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de <i>F. splendens</i>	59
16	DL50 del extracto metanólico de <i>F. splendens</i> sobre <i>A. salina</i>	59
17	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de <i>T. lucida</i>	60
18	DL50 del extracto metanólico de <i>T. lucida</i> sobre <i>A. salina</i>	60
19	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de <i>E.antisiphylitca</i>	60
20	DL50 del extracto metanólico de <i>E.antisiphylitca</i> sobre <i>A. salina</i>	60
21	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de <i>P. dactylifera</i>	60
22	DL50 del extracto metanólico de <i>P. dactylifera</i> sobre <i>A. salina</i>	60
23	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de <i>F.cernua</i>	61
24	DL50 del extracto metanólico de <i>F.cernua</i> sobre <i>A. salina</i>	61
25	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de <i>A. americana</i>	61
26	DL50 del extracto metanólico de <i>A. americana</i> sobre <i>A. salina</i>	61
27	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de <i>A. americana</i>	61
28	DL50 del extracto metanólico de <i>L. Mexicana</i> sobre <i>A. salina</i>	61
29	Porcentaje de viabilidad del extracto metanólico de <i>A.</i>	62

farnesiana sobre *A. salina*

30	DL ₅₀ del extracto metanólico de <i>A. farnesiana</i> sobre <i>A. salina</i>	62
31	IC ₅₀ del extracto metanólico de hojas de <i>L. frutescens</i> sobre la línea celular VERO.	62

NOMENCLATURAS

°C Grados centígrados

ATCC American Type Culture Collection

cel Células

CI₅₀ Concentración Inhibitoria Media

cm Centímetros

MIC Concentración Mínima Inhibitoria

d Días

g Gramos

% por ciento

h Horas

m Metros

MeOH Metanol

mg Miligramos

min Minutos

mL Mililitros

mm Milímetros

MTT 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromuro)

nm nanómetros

OMS Organización Mundial de la Salud

RF Ratio of Front

UV Ultravioleta

µm Milimicras

rpm Revoluciones por minuto

AC Aislado clínico

GC/MS Cromatografía de gases/acoplado a masas

cm Centímetros

PBS Buffer de sulfatos

HTS Tamizaje de alta eficiencia

DMSO Dimetil sulfóxido

DMEM Medio esencial mínimo Dulbeco

EPA Enviromental Protection Agency

DL₅₀ Dosis letal media

UFC/mL Unidades formadoras de colonia por mililitro

μL Microlitros

μg Microgramos

TLC Cromatografía en capa delgada

VERO Línea celular normal de riñón de mono verde africano

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud ha postulado que aproximadamente el 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional para la atención primaria de la salud. La resistencia de los microorganismos patógenos a los antibióticos ha provocado que las investigaciones se dirijan hacia la búsqueda de actividad antibacteriana de las plantas medicinales. En este trabajo se evaluó la actividad bactericida a las concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/mL, toxicidad con *Artemia salina* y citotoxicidad con la línea celular VERO, identificación parcial de la presencia de compuestos químicos de los extractos metanólicos de diez plantas medicinales del norte de México con actividad biológica contra bacterias patógenas de aislados clínicos (AC) y de cepa de referencia (CR). Se evaluaron los extractos metanólicos de las especies *Leucophyllum frutescens*, *Fouquieria splendens*, *Tecoma stans*, *Euphorbia antispythetica*, *Loeselia mexicana*, *Tagetes lucida*, *Phoenix dactylifera*, *Agave americana* y *Flourenzia cernua*. Todas las especies mostraron inhibición contra las bacterias excepto *Acacia farnesiana*. La actividad antimicrobiana por el método de difusión en placa con los extractos evaluados mostró mayor inhibición contra las bacterias Gram positivas de AC sin mostrar actividad contra las bacterias Gram negativas a excepción del extracto de *F. splendens* y *Phoenix dactylifera* que mostraron inhibición contra *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* de AC. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos que mostraron actividad a las concentraciones de prueba con las cepas de *S. aureus* de AC, *E. coli* 0157, *E. aerogenes* 9183, *E. cloacae* 9325 fue \leq a 30 µg/mL. Solo los extractos de *L. frutescens* y *T. lucida* resultaron tóxicos con una DL₅₀ de 290.88 µg/mL y 603.10 µg/mL respectivamente. La citotoxicidad con la línea celular VERO de las hojas de *L. frutescens* mostró una IC₅₀ de 58.56 y de *T. lucida* 53.88 µg/mL. A los extractos que mostraron actividad antibacteriana se les realizó bioautografía para identificar la fracción responsable de la actividad. Solo *L. frutescens* fue activo contra *S. aureus* de AC. Se aislaron tres fracciones por cromatografía en capa fina con R_f de 0.4, 0.5 y 0.6 respectivamente. Las fracciones se sometieron a evaluación de la actividad antibacteriana y las tres mostraron inhibición contra *S. aureus*. El extracto se analizó con CG-MS y se identificó el compuesto ácido homovanílico metil ester. Se concluye que las plantas evaluadas tienen actividad antibacteriana y los resultados validan científicamente el uso en Medicina Tradicional para el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

ABSTRACT

The World Health Organization has suggested that about 80% of the world population depends on traditional medicine for primary health care. The resistance of pathogens to antibiotics has caused research to be directed towards the search of antibacterial activity of medicinal plants. In this study we evaluated the bactericidal activity at concentrations of 1000, 500 and 250 mg / mL, toxicity with brine shrimp and cytotoxicity with VERO cell line. We also worked on the partial identification of the presence of chemical compounds in the methanolic extracts of ten medicinal plants of the north of Mexico with biological activity against clinical isolates of pathogenic bacteria, (AC) and a reference strain (CR). Methanol extracts were evaluated of *Leucophyllum frutescens*, *Fouquieria splendens*, *Tecoma stans*, *Euphorbia antisyphilitica*, *Loeselia Mexicana*, *Tagetes lucida*, *Phoenix dactylifera*, *Agave Americana*, *Flourensia cernua* and *Acacia farnesiana*. All species showed inhibition against bacteria except *Acacia farnesiana*. Antimicrobial activity by the plate diffusion method, with the extracts tested, showed greater inhibition against Gram positive AC, without showing activity against Gram negative bacteria, other than the extract of *F. splendens* and *P. dactylifera* which showed inhibition against *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* AC. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts that showed activity at test concentrations strains of *Staphylococcus aureus* (IC), *E. coli* 0157, *Enterobacter aerogenes* 9183, *Enterobacter cloacae* 9325 was $\leq 30 \mu\text{g} / \text{mL}$. Only extracts of *L. frutescens* and *T. lucida* were toxic with a LD₅₀ of 290.88 $\mu\text{g} / \text{mL}$ respectively. The Cytotoxicity with the VERO cell line using the leaves of *L. frutescens* showed an IC₅₀ of 58.56 and *T. lucida* of 53.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Bioautography was performed on the extracts that showed antibacterial activity, to identify the fraction responsible for the activity. Only *L. frutescens* was active against *S. aureus* (IC). Three fractions were isolated by thin layer chromatography with R_f of 0.4, 0.5 and 0.6 respectively. The fractions were subjected to evaluation of the antibacterial activity and all three showed inhibition against *S. aureus* IC. The extract was analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) and was identified as homovanillic acid methyl ester compound. The plants that were evaluated have antibacterial activity and the results validate scientifically their use in traditional medicine for the treatment of infectious diseases.

1.- INTRODUCCIÓN

Cuando el hombre tuvo que distinguir entre las plantas curativas de las que no lo eran inició el desarrollo gradual de la Medicina Tradicional, la cual se fue transmitiendo verbalmente o de forma escrita a través de papiros, tablas de barro cocido, pergaminos, tratados de plantas, farmacopeas y banco de datos entre otros (Barquero, 2007). Durante los pasados 5000 años, nuestros antepasados utilizaron los productos naturales como fuente primaria de medicinas, en la actualidad las plantas siguen siendo fuente importante de prototipos de antimicrobianos debido a la gran diversidad, flexibilidad, accesibilidad, disponibilidad y sobre todo a la variedad y complejidad de sus compuestos químicos (Saxena *et al.*, 2006). El 80 % de la población mundial, aproximadamente unos 4 mil millones de personas, utiliza las plantas como principal remedio medicinal para aliviar muchos de sus padecimientos. Llama la atención la creciente demanda de esta terapia sobre todo en los países de mayor desarrollo donde resurge la necesidad de lo natural y el rechazo a una medicina iatrogénica; por su parte en los países de menor desarrollo, constituye un recurso ancestral transmitido de generación en generación como parte de las tradiciones arraigadas en cada uno de ellos (OMS, 2004).

A lo largo de la historia, México ha sido una región de interés a nivel mundial por sus recursos naturales. La extraordinaria riqueza florística ubica a México en el cuarto lugar mundial, el amplio territorio que incluye áreas subtropicales, zonas templadas, desérticas y frías, ideal para el desarrollo de varias especies de plantas. El número de plantas medicinales en México asciende aproximada de 4,500 de especies de las cuales solo el 11% se ha estudiado químicamente, el 2.6 de forma biodirigida y solo el 1.9% con estudios farmacológicos y toxicológicos (Kakuko *et al.*, 2005).

Debido a esto, es importante la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica con potencial antimicrobiano en plantas que crecen en nuestro entorno. Para lograrlo, es necesario fomentar la investigación química y farmacológica con abordaje multidisciplinario, cuyos objetivos sean aislar los principales principios activos, identificarlos, determinar su estructura química y encontrar sus posibles aplicaciones (Cowan, 1993). Como resultado de los modernos procedimientos de investigación, aislamiento y experimentación farmacológica, nuevos compuestos derivados de los

productos naturales encuentran su camino hacia la medicina como sustancias purificadas a partir de plantas, animales y microorganismos, ejemplo de ello es *Ricinus communis* del que se obtiene el aceite de ricino usado como purgante, de *Colchicum autumnale* se obtiene la colchicina útil en el tratamiento de la gota, *Papaver somniferum* se obtiene la morfina utilizado como un potente analgésico, de *Atropa belladonna* se obtiene la atropina utilizada como sedante, de *Catharantus roseus* se obtiene la vincristina y vinblastina utilizados como antitumorales, de *Chinchona calisaya* se obtiene la quina utilizada en el tratamiento antipalúdico por tan solo mencionar algunos (Domingo *et al.*, 2003).

Los antibióticos que originalmente se desarrollaron a partir de productos naturales, han revolucionado el tratamiento de las enfermedades infecciosas, sin embargo con la aparición y diseminación de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos, se incrementó la necesidad de buscar nuevos agentes quimioterapéuticos efectivos. Son numerosas las investigaciones enfocadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un gran número de estudios han sido dirigidos hacia la evaluación de la actividad antimicrobiana en extractos y aceites esenciales, ejemplo de ello son las investigaciones realizadas en extractos de distinta polaridad de *Azadirachta indica* (neem), *Ruta graveolens* (ruda), *Cinamomum cassia* (canela), *Thymus sperpyllum* (tomillo) que mostraron inhibición contra *Escherichia coli*, *Salmonella infantis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Chlibek *et al.*, 2006; Alzoreky *et al.*, 2003; Ojala *et al.*, 2000).

Los problemas asociados con el desarrollo y diseminación de los microorganismos antibiótico-resistentes se ha incrementado a partir de la década de los 60's y se ha aceptado que la principal causa es el uso indiscriminado de antibióticos en la práctica clínica. Así mismo, en años recientes reportes científicos han demostrado que el uso de sustancias químicas antimicrobianas utilizadas en áreas hospitalarias, constituyen un factor importante en el desarrollo y selección de cepas antibiótico-resistentes (Gilbert y McBain, 2003). La resistencia a los antimicrobianos es considerada un problema de salud pública que se presenta mundialmente, en los últimos sesenta años se ha hecho notorio el impacto de la respuesta de los microorganismos a la presión selectiva que ejercen los antisépticos y biocidas, así como los compuestos quimioterapéuticos utilizados en los brotes de infecciones en los hospitales del mundo. Según estudios

epidemiológicos, América Latina se encuentra entre las regiones con mas alta incidencia de brotes nosocomiales (Cabrera y Gómez., 2007). Los problemas de resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos sintéticos y los efectos colaterales que poseen los antibióticos ha generado un particular interés por la búsqueda de plantas con actividad antimicrobiana (Rangel 2001). Estas aportan gran variedad de compuestos químicos con carácter antimicrobiano, algunos de los cuales muestran una actividad *in vitro* comparable a la de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la enfermedades infecciosas. El arsenal terapéutico de las plantas es incalculable, ya que hasta el momento se reconoce solo un porcentaje muy bajo de los compuestos producidos por el reino vegetal. Estas sustancias pueden ser utilizadas directamente o como base para la síntesis de nuevos principios útiles en el tratamiento de las infecciones (Domingoy López-Brea, 2003).

Por el interés de profundizar en el conocimiento de la flora mexicana y su posible contribución a la etnofarmacología, se diseñó este trabajo con el objetivo de encontrar nuevas fuentes de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de las especies vegetales *Tagetes lucida* (Cav), *Leucophyllum frutescens* (Berl.) I.M. Johnst, *Flourensia cernua* (DC), *Acacia farnesiana* (L) Willd, *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth, *Loeselia mexicana* (Lam) Brand, *Euphorbia antisiphilitica* (Zucc), *Phoenix dactilifera* (L), *Agave americana* (L), *Fouquieria splendens* (Engelm), contra bacterias de aislados clínicos y cepas de referencia (ATCC).

2. Definición del problema y justificación

La aparición y diseminación de microorganismos patógenos para los seres humanos resistentes a casi todos los antibióticos disponibles, plantea un serio problema terapéutico considerado actualmente como un problema de salud pública mundial. En los últimos sesenta años se ha hecho notorio el impacto de la respuesta de los microorganismos a la presión selectiva que ejercen los antisépticos, biocidas, así como los antibióticos utilizados en las enfermedades infecciosas. Estudios de investigación han demostrado que algunas plantas del desierto presentan actividad antimicrobiana *in vitro* por lo que es de esperarse que otras plantas del mismo hábitat presenten esta actividad biológica. La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa. Sin duda el reino vegetal posee mayor variedad de productos naturales potencialmente útiles en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. La Organización Mundial de la Salud ha recomendado validar farmacológicamente las plantas que utilizan los pobladores indígenas y de las zonas rurales para tratar sus enfermedades, un alto porcentaje de la población mexicana todavía utiliza la herbolaria para alivio de las mismas. Por estos motivos, el estudio de las plantas busca descubrir nuevos agentes antimicrobianos que sean eficaces con menos efectos tóxicos en el organismo humano. La justificación de este estudio es determinar el potencial antimicrobiano de los extractos metanólicos de diez plantas de la región Norte del país contra agentes bacterianos productores de enfermedades infecciosas las cuales han sido poco ensayadas o al menos en la literatura científica no ha trascendido el conocimiento de su experimentación.

3. Hipótesis

Los compuestos químicos de los extractos metanólicos de las plantas en estudio inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas y no presentan toxicidad sobre células normales de mamífero.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Identificar los principios activos de las plantas *Tagetes lucida* (Cav), *Leucophyllum frutescens* (Berl.) I.M. Johnst, *Flourensia cernua* (DC), *Acacia farnesiana* (L) Willd, *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth, *Loeselia mexicana* (Lam) Brand, *Euphorbia antisyphilitica* (Zucc), *Phoenix dactilifera* (L), *Agave americana* (L), *Fouquieria splendens* (Engelm), del Norte de México responsables de la actividad biológica sobre bacterias patógenas, además evaluar su toxicidad sobre células normales de mamífero.

4.1.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre bacterias de aislados clínicos y de referencia.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos que resulten activos en la primera evaluación.
3. Separar las fracciones de los extractos activos y evaluar la actividad antimicrobiana por el método de bioautografía.
4. Evaluar la actividad tóxica de los extractos metanólicos activos con el ensayo de *Artemia salina*.
5. Evaluar la citotoxicidad de los extractos sobre líneas celulares de mamífero (VERO)
6. Identificar los principios químicos de las fracciones biológicamente activas mediante el método de cromatografía de gases acoplada a masas.

5.- ANTECEDENTES

5.1 Generalidades

En los pueblos primitivos la gente atribuía el poder curativo de las plantas a la intervención de sus dioses, no se sabe con certeza cómo se empezaron a utilizar pero hay evidencia de que el hombre de Neandertal que vivió hace 60,000 años en el actual Irak, usaba las plantas con fines medicinales (Barquero, 2007). A lo largo de la historia se presentan otros ejemplos bien documentados sobre el tema, uno de ellos fue Hipócrates en la antigua medicina griega, Avicena en la cultura árabe y Paracelso en la cultura centroeuropea, que fueron auténticos especialistas en la aplicación de las plantas medicinales. En la época contemporánea existe un gran interés en la investigación de sustancias antimicrobianas de plantas y prueba de ello es que diferentes compañías farmacéuticas centran sus esfuerzos en este campo (Waizel y Salomon, 2005). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial en alguna ocasión ha utilizado la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de productos de plantas o sus principios activos (Bermúdez y Oliveira-Miranda, 2005; Ojala *et al.*, 2000).

La farmacoquímica ha desarrollado nuevos fármacos a partir de los principios activos aislados de las plantas y determinar su mecanismo de acción para uso en los seres humanos (Etkin, 1998). Las plantas son capaces de producir cientos de compuestos de diversa naturaleza química y distinta funcionalidad. Las propiedades medicinales de las plantas pueden provenir de cualquiera de sus partes (hojas, tallos, raíces, flores o semillas) que producen sustancias químicas llamadas metabolitos secundarios o principios activos, estos tienen la capacidad de producir efectos fisiológicos, que pueden ser benéficos o tóxicos según el principio activo de que se trate (Cragg *et al.*, 1997). La biodiversidad del reino vegetal en el mundo se estima entre 400,000 a 500,000 especies de plantas superiores, a las cuales solamente al 10% se les han realizado estudios

fitoquímicos y un menor porcentaje ha sido sometido a pruebas farmacológicas (Sasidharan *et al.*, 2011).

En la medicina moderna se les ha encontrado importantes aplicaciones a las plantas; son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos ((Bermúdez y Oliveira-Miranda, 2005).

5.2 Selección del material vegetal y preparación de los extractos

Debido a la amplia variedad y complejidad, las plantas son un reservorio de numerosos compuestos químicos que actúan como mecanismos de defensa de la planta contra los microorganismos y adaptan al vegetal a las condiciones adversas del medio ambiente (Das *et al.*, 2012). Se han desarrollado estrategias para seleccionar las plantas para una actividad determinada, Williamson y Okpako (1996) proponen cinco criterios que corresponden a la selección: al azar, tamizaje químico, etnomédico, quimiotaxonómico y actividad biológica. Las plantas poseen la capacidad de sintetizar sustancias de distinta naturaleza química conocidos como metabolitos secundarios los cuales se encuentran integrados intra y extracelularmente a las partes del vegetal (Green, 2004). La experimentación con la planta comienza con la extracción de los metabolitos que se encuentran disueltos en el citoplasma de la célula vegetal o formando sales que se encuentran incrustadas en las células. Después de triturada la planta se lleva a un proceso de maceración en donde el material vegetal esta en contacto con un disolvente (Booth *et al.*, 2012). Otro método de extracción se lleva a cabo utilizando diferentes disolventes con polaridad creciente empezando con hexano y aumentando la polaridad hasta llegar al acetato de etilo para arrastrar sustancias de polaridad intermedia, terminando con el empleo de alcohol que extrae del vegetal compuestos más polares (Desire *et al.*, 2010). Este procedimiento ayuda a que la extracción con solventes de diferentes polaridades arrastre el mayor número de metabolitos secundarios y de esta forma poder purificarlos más fácilmente. Uno de los principales problemas en el uso de

los extractos crudos de las plantas medicinales es que son mezclas de compuestos, es por ello que actualmente los extractos se fraccionan con solventes de distinta polaridad (Ncube *et al.*, 2008).

Los solventes más ampliamente usados en investigaciones de actividad antimicrobiana en plantas son el metanol, etanol y agua, predominando los solventes orgánicos, ya que se ha reportado que los extractos vegetales con estos solventes proporcionan mejor actividad antimicrobiana comparada con los extractos acuosos (Parekh *et al.*, 2006). El metanol en el proceso de maceración de las plantas se ha utilizado ampliamente para separar los principios activos presentes en los tejidos de las plantas. Las propiedades del metanol como buen solvente incluyen baja toxicidad, acción preservativa, incapacidad para formar complejos o disociarse y lo más importante, no interferir en los bioensayos (Singh *et al.*, 2012).

5.3 Actividad antimicrobiana de las plantas

Se ha postulado que las plantas pueden contener principios activos con actividad biológica sobre diferentes microorganismos (Tabla 1). Se han aislado alrededor de 12,000 compuestos procedentes de diversas especies vegetales que constituyen el 10% de los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Karou *et al.*, 2005).

Reportes acerca de las investigaciones realizadas en extractos de distinta polaridad de *Azadirachta indica*, *Ruta graveolens* (ruda), *Cinamomum cassia* (canela), *Thymus sperpyllum* (tomillo) mostraron inhibición contra *Escherichia coli* y *Salmonella infantis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* Ojala *et al.* (2000), Alzoreky y Nakahara (2003). En el estudio realizado por López *et al.*, (2007) reportaron que extractos crudos de *Azadirachta indica* muestran efecto inhibitorio en una amplia gama de microorganismos incluyendo algas, bacterias, hongos y protozoarios. En el estudio de tamizaje por Ojala *et al.*, (2000) con extractos metanólicos de siete especies vegetales de Finlandia contra bacterias Gram negativas y positivas, levaduras, hongos y hongos fitopatógenos encontraron que los extractos metanólicos de *Ruta graveolens* y *Petroselinum crispum* mostraron alta toxicidad contra *Rhizoctonia phytophthora*. En el trabajo llevado a cabo por Céspedes *et al.*, (2006) a partir del extracto metanólico de *Araucaria araucana* aislaron 5 lignanos y sus estructuras fueron dilucidadas por

métodos espectroscópicos los cuales fueron probados en ensayos de sensibilidad antimicrobiana, y reportaron que las bacterias Gram positivas utilizadas fueron más susceptibles al pinoresinol, mientras que el secoisolariciresinol mostró actividad antifúngica significativa frente a los hongos *Trametes versicolor* y *Ceratocystis pilifera* al inhibir su crecimiento micelial. El estudio de Hernández *et al.*, (2006) probaron la actividad antimicrobiana de *Tagetes lucida* contra ocho cepas de referencia de bacterias Gram negativas y positivas y cinco cepas de bacterias Gram negativas y positivas aisladas de muestras clínicas y una cepa de *Candida albicans*, ellos reportaron que el compuesto 5,7,4' trimetoxiflavona mostró actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram negativas y positivas. La investigación de González-Teuber *et al.*, (2006) reportó que el néctar del exterior de la flor de *Acacia farnesiana* contiene enzimas capaces de inhibir bacterias fitopatógenas. El ensayo de Varaprasad *et al.*, (2009), en el cual evaluaron cuarenta y nueve extractos metanólicos de plantas contra la actividad antifúngica de *Aspergillus niger*, reportaron que *Acacia farnesiana* disminuyó el crecimiento del hongo. Mata *et al.*, (2003) demostró que extractos crudos y fracciones de *Flourensia cernua* posee actividad fitotóxica, antialgas y antitermitas. En el estudio realizado por Molina-Salinas *et al.*, (2006) reportaron que los extractos hexánicos y acetónicos de las hojas de *Flourensia cernua* resultaron activos contra las cepas H37Rv (sensible a cinco drogas antituberculosas) y la cepa CIBIN/UMF:15:9 (resistente a todas las drogas antituberculosas). El extracto metanólico solo fue activo contra la cepa resistente. En un estudio de investigación por Alanís Garza *et al.*, (2012) en la búsqueda de nuevos medicamentos antituberculosos (antiTB) probaron una cepa sensible y una multidrogoresistente (MDR) de *M. tuberculosis*. Reportaron que el extracto metanólico de corteza de raíz de *Leucophyllum frutescens* posee actividad antiTB para ambas cepas. Ellos encontraron en la raíz de *L. frutescens* el compuesto furanolignano identificado como 2',5"-dimetoxisesamina con actividad antituberculosa.

Tabla 1. Grupos químicos obtenidos de plantas con actividad antimicrobiana (Domingo y López-Brea, 2003).

Grupo Químico	Compuesto	Especie	Actividad antimicrobiana
Fenoles simples	Timol	<i>Thymus officinalis</i> (tomillo)	General
	Ácido antemico	<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	<i>S. aureus</i> ,
	Terpenoide	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>S.thyphimurium</i> ,
			<i>Salmonella</i>
Quininas	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i> (hipérico)	VIH
Taninos		<i>Quercus rubra</i> (roble)	Bacterias y virus
		<i>Eucaliptus globulus</i> (eucalipto)	Virus
		<i>Melissa officinalis</i> (melisa)	
Cumarinas		<i>Marticaria chamomilla</i> (manzanilla)	Virus
Flavonas	Catequina	<i>Camelia ainensis</i>	<i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>S. mutans</i>
	Isoflavona	<i>Millettia thonningii</i>	<i>Shcistosoma</i>
	Quercitina	<i>Quercus rubra</i> (roble)	
Alcaloides	Coca	<i>Erythoxylum</i> (coca)	Cocos gran positivos
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos, <i>Lactobacillus</i>
	Mescalina	<i>Lophora williamsi</i> (peyote)	

5.4 Resistencia bacteriana

En los inicios del siglo XX, el descubrimiento de los antibióticos se convirtió en la solución a las múltiples enfermedades producidas por agentes infecciosos. Las bacterias como todos los seres vivos exhiben mecanismos biológicos que las facultan para adaptarse a diversas presiones ambientales. La resistencia bacteriana es la capacidad de un microorganismo de tolerar o resistir ciertas condiciones físico-químicas y biológicas adversas. Donde quiera que exista un cambio de susceptibilidad bacteriana provocado por un agente que ha sido poco efectivo en contra de cierto microorganismo, éste se considera como resistente. Muchos microorganismos han sido resistentes a un agente en particular por su naturaleza fisiológica o bioquímica, los microorganismos susceptibles pueden volverse insensibles por mutaciones o por la incorporación de información genética que codifica a la resistencia (Kummerer, 2000). El fenómeno de la resistencia se puede entender con base a dos factores, los antibióticos que actúan como un agente

selectivo que ayuda a propagar a los microorganismos y el segundo factor son los genes de resistencia. Un aspecto importante que contribuye a la diseminación de la resistencia es la capacidad de los genes de resistencia para moverse hacia otras bacterias por una variedad de medios genéticos (Levy, 2002). El incremento en el uso irracional y el abuso de los antibióticos y la respectiva presión selectiva que ejercen, aunado a su empleo en tratamientos en el campo veterinario que pueden llegar a generar resistencias en gérmenes que afectan a los humanos, así como el hecho de que la propia flora bacteriana normal del hombre pueda ser en muchas ocasiones resistente a la acción de los antibióticos son los factores más importantes que contribuyen a la aparición de diversas clases de resistencia bacteriana (Smith *et al.*, 2005). La resistencia que ejercen las bacterias a los antibióticos, antisépticos y desinfectantes, es un problema de salud pública que se creía superado (Ojo *et al.*, 2007). Las cepas patógenas resistentes han surgido en los hospitales principalmente debido al uso indiscriminado de antibióticos, al tiempo de exposición y a la deficiente eliminación de los mismos, tratamientos invasivos como hemodiálisis, las altas posibilidades de transmisión y el estado inmunocomprometido de los pacientes, los hace susceptibles a las infecciones con patógenos oportunistas (Dakie *et al.*, 2005). Aunque el arsenal de antibióticos es abundante y se ha logrado un gran avance en el tratamiento de infecciones cada vez más complejas, durante los últimos 60 años no se han descubierto medicamentos realmente novedosos, con mecanismos de acción capaces de modificar el espectro actual de cubrimiento y lo que es más grave, de superar los mecanismos de resistencia bacteriana (Levy, 2002). Debido a esto, es de gran trascendencia la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana de origen vegetal; para lograr esto se hace necesario el uso de la investigación fitoquímica, la cual cubre un amplio campo de trabajo cuyos objetivos principales son aislar principios activos, identificarlos, determinar su estructura y encontrar sus posibles aplicaciones (Rodríguez *et al.*, 2010).

5.5 Análisis fitoquímico

La investigación de los metabolitos secundarios ayuda a comprender la bioquímica y fisiología de los organismos que los producen y su mejor aprovechamiento con fines farmacológicos (Willimason y Okpako, 1996). Algunos de estos compuestos han sido de gran beneficio para el desarrollo de medicamentos y son una rica fuente de precursores de nuevas estructuras moleculares con actividad biológica (Mishra y Tiwari, 2011). La

desaparición de la selva tropical como fuente de compuestos químicos con utilidad farmacológica, lleva a la rápida extinción de muchas especies vegetales, lo que motiva a promover y apresurar los estudios fitoquímicos y farmacológicos de las especies utilizadas en la medicina popular (Elvin-Lewis, 2001; Etkin, 1998). En la investigación fitoquímica, se utilizan métodos de separación, principalmente cromatográficos, y métodos espectroscópicos para la elucidación estructural. La espectroscopia es una técnica que mide la respuesta de una molécula a la aportación de energía. El espectro resultante es una serie de bandas que muestran la magnitud de la respuesta en función de la longitud de onda de la energía incidente. La fuente de energía puede ser de fotones ópticos (espectroscopia ultravioleta, visible e infrarroja) o de energía de radiofrecuencia (espectroscopia de resonancia magnética nuclear). Esta técnica se utiliza una vez que la mezcla se haya separado en sus componentes y de esta forma interacciona con la radiación electromagnética. El aislamiento e identificación de los constituyentes vegetales en la actualidad se realiza con mayor exactitud y rapidez con el desarrollo de mejores y nuevas herramientas en química analítica. Algunas de las técnicas analíticas útiles son la cromatografía, los análisis espectrales de resonancia magnética nuclear, análisis infrarrojo y la espectrometría de masas en sus diferentes variantes (Harvey, 1999). La estructura de los principios activos con actividad antimicrobiana es diversa y son clasificados en los siguientes grupos; fenoles simples y ácidos fenólicos, quinonas, flavonoides, taninos, terpenos, alcaloides, aceites esenciales, polipéptidos y otros grupos aún sin clasificar (Tabla 2) (Kuklinsky, 2000).

Según el manual de principios bioactivos de las plantas publicado por Herber, 2007, describe la estructura química de 3,000 compuestos aislados de productos naturales con actividad antimicrobiana, entre otras sustancias químicas reporta el ácido aristolochico, diantalexinas, aminas como la diantramina, metoxibracinina, alcaloides indólicos como la cantina, 3 antoxiluma, usambrarina, voacamina, voacanga, estos últimos con actividad antibacteriana específicos contra Gram positivos (Tabla 3). Huang (1999) encontró alcaloides presentes en *Coptis chinensis* que igualmente están presentes en especies de las familias Verberidaceae, Anonaceae, Menispermaceae, Papaveraceae y Rutaceae, estos compuestos son la verberina, worenina, copticina, palmatina, jatroricina y columbamina.

Tabla 2. Constituyentes bioactivos de algunas plantas con actividad biológica.

Nombre científico	Nombre común	Constituyentes bioactivos	Referencia
<i>Artemisia vulgaris</i>	Hierba de San Juan	Alcaloides, cumarinas, flavonoides, saponinas, esteroides, taninos y terpenos.	Khan <i>et al.</i> , 2009.
<i>Bougainvillea glabra</i>	Bugambilia	Betacianina, flavonoides, taninos y alcaloides.	Edwin <i>et al.</i> , 2007
<i>Casimiroa pringlei</i>	Zapotillo	Piperitona, Eucaliptol, α -terpineol.	Ponce-Monter <i>et al.</i> , 2008.
<i>Phalaenopsis hybrids</i>	Vanda	Monoesteres 1,2 monoesteres de pirrolizidina.	Frolich <i>et al.</i> , 2006.
<i>Pycnocycla spinosa</i>		Alcaloides, Flavonoides, Saponinas.	Sadraei <i>et al.</i> , 2003.
<i>Psidium guajava</i>	Guayaba	Glicosidos quercetenicos, como guajaverina, isoquercitrina, hiperina, quercitrina y quercetina 3-O-gentobiosido.	Gálvez <i>et al.</i> , 2001.
<i>Timus vulgaris</i>	Tomillo	Fenoles volátiles, flavona luteolina.	Engelbertz <i>et al.</i> , 2012.
<i>Valeriana procera</i>	Valeriana	Flavonoides, ácidos valerenicos, lignanos y monoterpénoides.	Déciga-Campos <i>et al.</i> , 2007.

Tabla 3. Compuestos químicos de algunas plantas con actividad antibacteriana

Nombre científico De la planta	Compuesto químico	Actividad antibacteriana	Referencia
<i>Boophone disticha</i>	Bufanidina, Distichamina	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Chesman L, <i>et al</i> 2012
<i>Hymenoxys robusta</i>	Inositol, Vermerina	<i>S. aureus</i>	Fortuna AM <i>et al</i> 2011
<i>Maytenus blepharodes</i>	Zeylasterona	<i>S. aureus</i>	De León <i>et al.</i> , 2010
<i>Avicennia officinalis</i>	Hidroxy-4ácido metoxybenzoico y ácido oleico	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	Bhimba <i>et al.</i> , 2010
<i>Eremophila duttonii</i>	Diterpenos de la clase serulatano	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	Smith <i>et al.</i> , 2007

5.6 Taxonomía de las Plantas estudiadas

5.6.1 *Leucophyllum frutescens* (Berland.) I.M. Johnston

REINO: Plantae

PHYLUM: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

FAMILIA: Scrophulariaceae

GÉNERO: *Leucophyllum*

ESPECIE: *frutescens*

Nombre común: cenizo

Es un arbusto que crece a uno o dos metros y tiene muchas ramas y hojas grises. Las flores crecen como campana, con un tamaño de 25 mm, y de color rosa, tres veces florece al año, crece junto a gatuno y chaparro prieto es una hierba perene medicinal (UNAM, 2009).



Figura 1. *L. frutescens* (UNAM 2009)

5.6.2 *Flourensia cernua*

REINO: Plantae

PHYLUM: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

FAMILIA: Asteraceae

GÉNERO: *Flourensia*

ESPECIE: *cernua*

Nombre común: Hojasén.

Se distribuye ampliamente en las zonas desérticas del norte de México y del sur de Estados Unidos. A lo largo del territorio de México, la hojasén se utiliza en forma de infusión para el tratamiento de diversas enfermedades gastrointestinales (dolor de estómago diarrea y disentería). También se emplea como purgante, expectorante y antirreumático (Estrada *et al.*, 2005).



Figura 2. *F. cernua* (UNAM 2009)

5.6.3 *Tecoma stans*

REINO: Plantae

PHYLUM: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

FAMILIA: Bignoniaceae

GÉNERO: *Tecoma*

ESPECIE: *stans*

Nombre común Lágrimas de San Pedro, tronadora y retama. Es un arbusto ó árbol de 1 a 8 metros de altura. Las hojas están divididas de 5 a 13 foliolos, con o sin vellosidades en el reverso. Las flores semejan pequeñas campanas amarillas y están agrupadas en racimos vistosos generalmente en las puntas de las ramas. Los frutos son cápsulas alargadas de hasta 21 cm, color verde y cuando maduran se tornan cafés, contienen muchas semillas aplanadas y provistas de alas (UNAM, 2009).

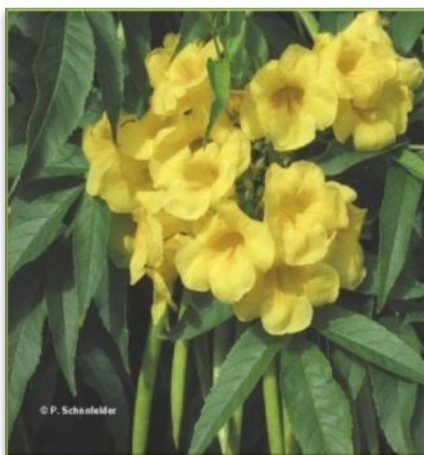


Figura 3. *Tecoma stans* (UNAM 2009)

5.6.4 *Euphorbia antisiphilitica*

REINO: Plantae

PHYLLUM: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

FAMILIA: Euphorbiaceae

GÉNERO: *Euphorbia*

ESPECIE: *antisiphilitica*

Nombre común Candelilla. Es un arbusto o árbol pequeño de 6 m de altura. Las hojas están divididas entre 3 o 4 pares de hojitas; son delgadas y de color verde brillante. Las flores son amarillas, los frutos son vainas de 9 cm de largo y tiene numerosas semillas. Es una planta cosmopolita tropical que crece en climas semicálidos y templados, entre los 1840 y los 2750 msnm. Este arbusto está asociado a bosque tropical caducifolio, bosque de juníperos y bosque mixto de pino-encino (UNAM, 2009).



Figura 4. *E. antisiphilitica* (UNAM 2009)

5.6.5 *Loeselia mexicana*

REINO: Plantae

SUBREINO: Traqueobionta

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

SUBCLASE: Asteridae

ORDEN: Asterales

FAMILIA: Polemoniaceae

GÉNERO: *Loeselia*

ESPECIE: *mexicana*

Nombre común: Espinosilla hierba de la virgen, chuparro, y mirto silvestre. Es una planta que mide de 50 a 80cm de altura, que se siente áspera al tacto y tiene abundantes pelos. Sus hojas son rígidas, más anchas en la parte de abajo y arriba puntiagudas, en sus bordes tiene denticillos con pequeñas espinas. Las flores son tubulosas y rojas, crecen en las axilas de las hojas. Los frutos son cápsulas globosas con 2 a 5 semillas aladas (UNAM, 2009).



Figura 5. *Loeselia mexicana* (UNAM 2009)

5.6.6 *Acacia farnesiana*

REINO: Plantae

SUBREINO: Traqueobionta

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

SUBCLASE: Asteridae

ORDEN: Fabales

FAMILIA: Mimosáceae

GÉNERO: *Acacia*

ESPECIE: *farnesiana*

Nombre común Huizache

Es un arbusto o árbol hasta de 7 m de altura, muy ramificados de tallos lisos con muchas espinas blancas o blanquecinas de 1 a 5 cm de largo. Las hojas son pequeñas y divididas en hojitas más chiquitas que dan la apariencia de plumas, tiene flores como motitas amarillas muy perfumadas. Los frutos son vainas, que pueden estar solas o agrupadas, un poco alargadas, con las puntas redondeadas, gruesas y aplanadas, con semillas numerosas en forma de riñón de color pardo-amarillo (UNAM 2009).



Figura 6. *Acacia farnesiana* (UNAM 2009)

5.6.7 *Tagetes lucida*

REINO: Plantae

SUBREINO: Traqueobionta

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

SUBCLASE: Asteridae

ORDEN: Asterales

FAMILIA: Compuestas

GÉNERO: *Tagetes*

ESPECIE *lucida*

Nombre común: Hierbanís, Jericón, Pericón.

Es una hierba erecta de 30 cm a un metro de altura, muy ramificada y que huele a anís. Las hojas son de un mismo ancho tanto en la parte axial, como en la distal, con los bordes dentados y de color verde oscuro, de olor y sabor a anís. Tiene las flores dispuestas en cabezuelas agrupadas en racimos, están en las partes terminales de la planta y son de color amarillo. Sus frutos son negros y pequeños. (UNAM, 2009).



Figura 7. *Tagetes lucida* (UNAM 2009)

5.6.8 *Fouquieria splendens*

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliophyta

SUBCLASE: Asteridae

ORDEN: Magnoliopsida

FAMILIA: Fouquieriaceae

GÉNERO: *Fouquieria*

ESPECIE: *splendens*

Nombre común Ocotillo

Arbusto o árbol bajo, de 2 a 10 m de altura, tronco basal corto, de 15 a 25 cm de diámetro, ramificado cerca de la base en 6 a 30 tallos erectos o recurvados, corteza externa verde a café-amarillenta, exfoliante en pequeñas tiras (Figura 8), espinas de 15 a 25 mm de largo, rectas o curvas; hojas de los brotes cortos 4 a 11, lineares patuladas ampliamente obovadas, de 17 a 35 mm de largo, por 5 a 11 mm de ancho, agudas a redondeadas y emarginadas en el ápice, cuneadas en la base; panícula estrechamente cónica a cilíndrica, de 10 a 20 cm de longitud, raquis de color púrpura a rojizo; sépalos anaranjado-rojizos, rosados a blanco-amarillentos, ampliamente ovados, oblongos a casi reniformes, de 4.5 a 6 mm de longitud, 3.5 a 5.5 mm de ancho, obtusos emarginados en el ápice; corola anaranjado-rojiza, rosado purpúrea, rosado-amarillenta a amarilla clara, de 10.5 a 28 mm de largo, tubo de 6.5 a 22 mm de largo, por 3.5 a 6 mm de ancho en la garganta, pubescente en su interior con una banda de 2 a 5 mm de pelos unicelulares cerca de la base. La aparición periódica no estacional de las hojas de esta especie depende de la incidencia de la precipitación pluvial (UNAM, 2009).



Figura 8. *F. splendens* (UNAM 2009)

5.6.9 *Agave americana*

Reino: Plantae

SUPERCLASE: Monocotyledoneas

CLASE: Liliopsida

ORDEN: Asparagales

FAMILIA: Agavaceae

GÉNERO: *Agave*

ESPECIE: *americana*

Nombre común: pita

La planta tiene forma de piña (o ananá) de la cual salen sus hojas o pencas, a veces rectas y otras dobladas de manera caprichosa, carnosas pero duras, de bordes espinosos, a veces de color amarillo y con una púa en la punta. Las floraciones ocurren solamente cuando la planta tiene aproximadamente 15 años de edad o más. Las hojas se disponen en la base del tallo que acaba en un racimo de flores, las hojas son ricas en fibra, el tallo de la flor es enorme (15 a 40 pies) y las flores son de color amarillo pálido (UNAM, 2009).



Figura 9. *Agave americana* (UNAM2009)

5.6.10 *Phoenix dactylifera*

REINO: Plantae

FAMILIA: Arecaceae

GÉNERO: *Phoenix*

ESPECIE: *dactylifera*

Nombre común: Palma datilera.

Palma dioica de tronco único o ramificado en su base de 20 m de altura y 30-40 cm de ancho, cubierto con los restos de hojas viejas. Hojas pinadas de 6-7 m de longitud con foliolos de unos 445 cm de longitud de color glauco. Inflorescencias muy ramificadas naciendo de entre las hojas flores masculinas de color crema y femeninas amarillas. Produce frutos oblongos ovoides de 3-9 cm de longitud de color naranja con pulpa cremosa y dulce (UNAM, 2009).



Figura 10. *P. dactylifera* (UNAM 2009)

5.7 Cepas bacterianas: Características fisiológicas y morfológicas

Las bacterias utilizadas en este trabajo fueron bacterias Gram positivas y Gram negativas.

5.7.1 Bacterias Gram negativas.

Los bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae son los aislamientos mas frecuentes recuperados de muestras clínicas. Distribuidos en la naturaleza en forma amplia, estos microorganismos se encuentran en el suelo, agua y como lo indica el nombre de la familia dentro del tracto intestinal de seres humanos y animales. Los miembros de la familia Enterobacteriaceae pueden ser incriminados en cualquier tipo de enfermedad infecciosas y recuperados de cualquier muestra recibida en el laboratorio (Winn *et al.*, 2008). Las enterobacterias son bacilos Gram negativos pequeños (0.5 por 0.3 μm), no forman esporas, pueden ser móviles o no móviles, algunas especies poseen cápsula bien definida, poseen fimbrias o pilis y son los responsables de la fijación de las células bacterianas a otras bacterias, células huésped y bacteriófagos. Son microorganismos facultativos con diversidad bioquímica. Por definición todos los miembros de la familia fermentan la glucosa, reducen nitratos a nitritos y son oxidasa negativos. Las Enterobacteriaceae representan herramientas útiles para los genetistas y son los microorganismos que se emplean con gran frecuencia en desarrollo de DNA recombinante. Son destruidos con relativa facilidad por el calor y por concentraciones bajas de germicidas y desinfectantes comunes (Jawetz *et al.*, 2005). Algunos ejemplos de Enterobacterias se describen a continuación.

5.7.1.1 *Klebsiella pneumoniae* (Hernández, 2003).

Taxonomía

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacter

Clase: Gamma-proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Klebsiella*

Especie: *pneumoniae*

Características morfológicas y fisiológicas

Klebsiella pneumoniae es una bacteria aerobia, quimioorganotrofa y Gram-negativa (gran cápsula de polisacáridos), inmóvil (Figura 12). Es un patógeno humano que produce infecciones del tracto urinario, septicemia, e infecciones de tejidos blandos (ejemplo neumonías). Están asociadas con infecciones del tracto urinario. *Klebsiella pneumoniae* es un patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias. Usualmente las manos contaminadas del personal son el vehículo responsable de brotes epidémicos (González-Vértiz *et al.*, 2001; Vernon *et al.*, 2003; Lugo, 2005).

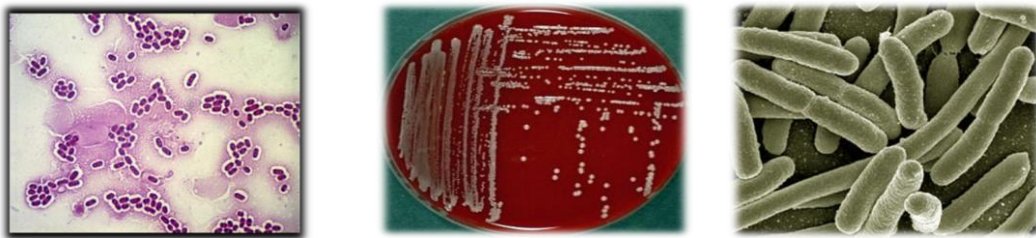


Figura 11. *Klebsiella pneumoniae* Gram y microfotografía electrónica (Jawetz, 2008).

5.7.1.2 *Escherichia coli* (Madigan, 2009).

Taxonomía

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma-proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *coli*

Características morfológicas y fisiológicas.

Escherichia coli es un organismo procarionte que se encuentra en los intestinos animales, es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos que rodean su cuerpo, no forman esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa (Figura 13). En las mujeres causa entre el 80 y 90% de las infecciones urinarias primarias y entre el 70 y 80 % de episodios recurrentes, mientras que en los hombres causa entre el 40 y 50 % de los episodios (Jawetz 2005). Los miembros del género *Escherichia* son pobladores casi universales del tracto intestinal del hombre y de los animales homeotermos. *Escherichia* contribuye también probablemente a consumir oxígeno haciendo por tanto anaerobio el intestino grueso, tan solo en raras ocasiones *Escherichia* es patógeno. Algunas cepas se han visto implicadas en diarreas infantiles, pudiendo también causar infecciones en el tracto urinario. Las cepas entero patógenas de *E. coli* son más frecuentes en infecciones del tipo disentérico y fiebres generalizadas (Madigan, 2009).

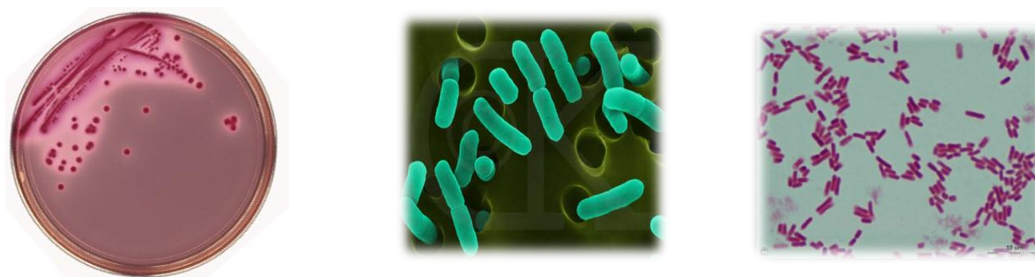


Figura 12. *Escherichia coli* Gram y microfotografía electrónica (Smith, 2005).

5.7.2. Bacterias Gram positivas.

Las bacterias Gram positivas, especialmente los cocos, son los microorganismos aislados con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas humanas en el laboratorio de microbiología. Estas bacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden ser recuperadas a partir del ambiente o como habitantes comensales de la piel, mucosas y otros sitios del cuerpo de los seres humanos y animales. Los cocos Gram positivos producen una variedad de infecciones que incluyen: foliculitis, furúnculos, carbunco,

abscesos, faringitis, endocarditis, erisipela, celulitis, neumonía y bacteremia (Winn *et al.*, 2008). Enseguida se describen las características de *S. aureus*.

5.7.2.1 *Staphylococcus aureus*

El *S. aureus* es un patógeno importante para los seres humanos. Casi toda persona padece de algún tipo de infección causada por este microorganismo durante su vida, que varía en gravedad desde intoxicación alimentaria o infecciones cutáneas menores hasta infecciones graves potencialmente mortales (Jawetz, 2005).

Clasificación taxonómica

DOMINIO: Bacteria

REINO: Eubacteria

FILO: Firmicutes

CLASE: Bacilli

ORDEN: Bacillales

FAMILIA: Staphylococaceae

GENERO: *Staphylococcus*

ESPECIE: *aureus*

S. aureus es una bacteria esférica (coco) aproximadamente de 1µm de diámetro, inmóviles que al ser examinada en el microscopio aparece agrupada en conjuntos en pares, en cadenas cortas o en grupos en forma de racimos de uva, no tienen flagelos, no forman esporas y excepcionalmente pueden tener cápsula. Estos organismos son Gram-positivos, muchas veces, pero no siempre presenta un pigmento de color amarillo en el medio de cultivo. Algunas cepas son capaces de producir una toxina proteica muy estable al calor que causa enfermedades en los humanos (Fig. 11). Para la detección de *S. aureus* se requiere la prueba de la coagulasa que permite diferenciar al *S. aureus* de otras especies del género *Staphylococcus*. La coagulasa es una enzima que estimula la conversión del fibrinógeno en fibrina, por lo que comprueba la facultad de un microorganismo de coagular el plasma por acción de esta enzima. Si es coagulasa positivo, se produce una turbidez alrededor de la colonia, debida a la coagulación del

plasma. Para una mayor certeza en la identificación de un *S. aureus* se utiliza la detección de antígenos mediante el test de látex (Prescott, 2004).



Figura 13. *Staphylococcus aureus* fotografía macroscópica y microscópica de (Prescott *et al.*, 2004).

5.8 Métodos para evaluar la efectividad antimicrobiana.

En los últimos años se ha centrado el interés en el desarrollo de técnicas para el ensayo de agentes antibacterianos, estos permiten que el laboratorio pueda determinar rápida y exactamente las concentraciones de dichos agentes en diferentes muestras. Se utilizan varios métodos para la búsqueda de agentes antimicrobianos: ensayo microbiológico, inmuno enzimático, fluorescencia, cromatografía en líquido de alta presión y métodos moleculares. Los principales métodos para determinar la efectividad de un microorganismo a un compuesto químico son los métodos de dilución en caldo, prueba de difusión, determinación de células sobrevivientes, recuento de células por el método de vaciado en placa. La selección del método de análisis dependerá del objetivo de la investigación (Cowan *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 2003, Ramírez *et al.*, 2009).

5.8.1 Método de dilución en caldo

En los métodos de dilución para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de un agente químico a un microorganismo, se inoculan a un cultivo del microorganismo en estudio, cantidades específicas del agente químico, preparado en concentraciones decrecientes en caldo o agar por la técnica de dilución seriada en tubo. Se determina la susceptibilidad del microorganismo, después de un período de incubación de 48 h, por la observación macroscópica de la presencia o ausencia de crecimiento en las distintas

concentraciones del agente químico. La concentración mínima del agente antimicrobiano que no muestra crecimiento manifiesto, es la medida del efecto bacteriostático del agente químico sobre el microorganismo y por lo común se le menciona como concentración mínima inhibitoria. Este método se considera el más exacto para la determinación de la susceptibilidad en volumen medido (en unidades o microgramos) del compuesto a evaluar. Es un procedimiento que lleva mucho tiempo y además resulta muy costoso por eso su empleo se limita a casos especiales sobre todo cuando se desean resultados cuantitativos (Cowan *et al.*, 1993).

5.8.2 Método de difusión de agar en disco

Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana. En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares (Winn *et al.*, 2008). Las metodologías aplicadas siempre consideran la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar, con el ánimo de evitar un crecimiento exhaustivo el cual puede variar significativamente la respuesta del extracto vegetal o aceite, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores de éste para inhibir el crecimiento del microorganismo. La concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio ha sido estandarizado en 5×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, lo cual equivale a un patrón de 0.5 en la escala de MacFarland. Es recomendable tomar el inóculo de cultivos en la fase exponencial de crecimiento y siempre tomar 4 o 5 colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas (Hernández *et al.*, 2003). Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller Hinton y agar tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras (Winn *et al.*, 2008). El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles. La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer (Método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de

Susceptibilidad de (NCCLS, 2001), de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Doughari, 2006).

En este método, se colocan con todo cuidado sobre la placa de cultivo en agar, inoculada con el microorganismo a estudiar, discos de papel filtro impregnado con diferentes agentes antimicrobianos en concentraciones específicas. Se incuba la placa 24 h y se observa la aparición de una zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco que contiene el agente antimicrobiano al cual es susceptible el microorganismo, los microorganismos que son resistentes crecerán hacia la periferia del disco. Su sencillez, rapidez de ejecución, economía y reproducibilidad la convierten en una de las pruebas mas útiles, y con seguridad la más empleada para la determinación de la susceptibilidad a agentes antimicrobianos (Forbes *et al.*, 2007; NCCLS, 2002).

5.8.3 Método de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés, Minimal Inhibition Concentration).

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos. Los ensayos de sensibilidad han de estar convenientemente normalizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que

se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar) (Hernández *et al.*, 2003). Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (macrodilución). Esta metodología es muy complicada, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución con caldo. Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. Son los métodos indicados cuando, además de la actividad inhibitoria, se quiere determinar también la actividad bactericida. (NCCLS, 2002).

5.9 Bioautografía

Este ensayo puede representar una herramienta útil para la purificación de sustancias antibacterianas, o como una técnica de tamizaje fitoquímico preliminar, o un fraccionamiento biodirigido, realizando el ensayo a través de cromatogramas, que permitan la localización de los compuestos activos, incluso en matrices complejas como los derivados de productos naturales. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de cromatografía delgada (TLC) (Ncube *et al.*, 2008; Schmourlo, 2004). La bioautografía es una técnica sencilla y rápida que combina las ventajas de la cromatografía en capa fina y la detección de actividad antimicrobiana. Determinar la eficacia de esta técnica puede facilitar el panorama en el aislamiento de sustancias antimicrobianas presentes en mezclas complejas. La metodología que se diseñe para desarrollar esta técnica depende del microorganismo que se va a evaluar, ya que requiere el conocimiento de las condiciones inherentes al crecimiento como; la curva de crecimiento microbiano. Hasta ahora, la bioautografía se ha realizado con pocos microorganismos, entre los cuales están *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora* y *Escherichia coli* (Nostro *et al.*, 2000; Valgas *et al.*, 200; Mbata *et al.*, 2006).

5.10 Identificación microbiana

La identificación del género y la especie de los microorganismos se debe realizar a partir de cepas puras, las cuales pueden estar en el medio en que se aisló o en un agar gelosa en pico de flauta. La identificación de las bacterias tradicionalmente se ha realizado en tubos que contienen diferentes substratos (pruebas bioquímicas), observándose la actividad fisiológica que aunada a las características de morfología colonial, tinción de Gram, pruebas serológicas y perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos, permiten definir el género y especie de las bacterias y levaduras (Cowan *et al.*, 1993). Actualmente existe una diversidad de métodos que se pueden emplear en la identificación de las bacterias a nivel de especie, sin embargo, en ocasiones es necesario además realizar la tipificación y caracterización de un grupo de cepas de la misma especie, para lo cual se emplean métodos fenotípicos, que se basan en la caracterización de los productos que se obtienen de la expresión genética, ejemplos de estos lo constituyen las pruebas bioquímicas, pruebas serológicas, pruebas de resistencia o susceptibilidad, pruebas de susceptibilidad a bacteriófagos, pruebas de susceptibilidad a bacteriocinas y ensayos de electroforesis de enzimas (Hernández *et al.*, 2003).

5.11 Toxicidad con el bioensayo de *Artemia salina*

Lo natural no siempre es inocuo, los compuestos bioactivos son siempre tóxicos a altas dosis (McLaughlin *et al.*, 1998). La evaluación de la actividad tóxica de las plantas medicinales juega un papel importante para el establecimiento de los criterios de seguridad y efectividad promovidos por la Organización Mundial de la Salud (Vidal *et al.*, 2009; Kumar y Shukla, 2003). Para la seguridad y eficacia de las fitomedicinas y productos herbolarios, además de las pruebas fitoquímicas y farmacológicas deberían documentarse estudios de su toxicidad (Bilia y Riva., 2000). La prueba *in vitro* de toxicidad con larvas de *Artemia salina*, es un ensayo de mucha utilidad en la búsqueda de nuevas drogas antitumorales. Se considera como una prueba general de toxicidad y un complemento de valoración farmacológica de extractos de plantas (Meyer *et al.*,

1982; Molina *et al.*, 2006). Tiene la ventaja de ser un bioensayo sencillo, rápido y altamente sensible. Con éste bioensayo, es posible determinar la dosis letal media (DL₅₀) de los componentes activos a partir de pequeñas cantidades de muestra en términos de concentración (µg/mL), con un intervalo de confianza del 95% (Balandrin y Kinghorn, 1993). La biología y la fisiología de las larvas de *Artemia salina* se han estudiado extensamente, debido a que éstas son altamente sensibles a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas, se considera que una planta es tóxica cuando la DL₅₀ es menor a 200 µg/mL (McLaughlin *et al.*, 1998).

5.12 Citotoxicidad con líneas celulares de mamífero

Los ensayos de citotoxicidad, son capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular (Arencibia *et al.*, 2003).

Comúnmente, en los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares, se emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento. La mayoría de éstos son de punto final, al usarse de forma destructiva, lo cual imposibilita seguir el comportamiento de las células después de ser sometidas a un tratamiento traumático. Una prueba *in vitro* ideal para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad debe tener como características principales: ser simple, rápida, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura, efectiva en la medida de la población celular viable y, que no muestre interferencia con el compuesto a evaluar. Más aun: si el método es aplicable a técnicas de barrido o tamizaje de alta eficiencia (HTS) y las células pueden ser usadas para más experimentos se habrá adquirido una herramienta excepcional (Anoopkumar-Dukie *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2000). Existen diferentes métodos para realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Primero, el uso de colorantes tales como cristal violeta y sulforrodamina B, que colorean componentes específicos de las células y permiten medir residuos celulares después de un tiempo de incubación con el compuesto evaluado. Segundo, los detectores

de liberación de componentes constitutivos celulares, que miden la actividad de enzimas tales como lactato deshidrogenasa, y finalmente, aquellos que miden la función metabólica de las células usando las sales de tetrazolio: bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT);(3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboxi-metoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) (MTS) y (23-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)- 2H-tetrazolio-5-carboxanilido) (XTT), los cuales al ser reducidos a formazán producen una intensa coloración. El método más empleado es la reducción metabólica de MTT, basado en la reducción de 3-(4.5-dimeltiltiazol-2-yl)-2.5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). Este colorante amarillo pálido, soluble en agua, es reducido tempranamente en células viables, por componentes de la cadena respiratoria, a formazán (cristales azul violeta, insoluble en agua), fundamentalmente por la respiración (deshidrogenasas mitocondriales) y su flujo de electrones, lo cual es intrínsecamente tóxico para las células (Putnam *et al.*, 2002; Bernas y Dobrucki, 2002). Dicho método fue desarrollado por (Mosmann 1983) como método colorimétrico cuantitativo de microtitulación para la determinación de la supervivencia y capacidad de proliferación de células mamíferas, y es preciso y rápido. Así mismo otro colorante utilizado en los ensayos de citotoxicidad, resazurina (azul no fluorescente) es reducida a resofurina (rosado altamente fluorescente), por oxidoreductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de células viables. La resofurina es excretada al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o la citotoxicidad de sustancias sobre células humanas, animales, bacterias e incluso hongos. Este colorante es poco tóxico para las células (no así otras técnicas descritas), y permite la continuidad de estudios en las mismas células, economizando tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son muy escasas y preciadas. Además, es sensible y altamente reproducible. Es posible obtener una medida de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm y/o fluorescencia en 530 nm 590 nm, ya que este colorante tiene propiedades tanto cromóforas como fluoróforas. Por ello, los métodos de reducción de resazurina y MTT reconocidos como sistemas de medida indirecta de masa celular, son útiles para evaluar la viabilidad y supervivencia en tratamientos de citotoxicidad (Drumond y Waigh, 2000., Lieberman *et al.*, 2001; Rolón *et al.*, 2006; Escobar *et al.*, 2010).

5.13 Cromatografía de gases acoplada a masas.

La cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) es un método que combina las características de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas para la identificación de sustancias diferentes dentro de una muestra de prueba. La tecnología GC-MS es muy aceptada como "estándar de oro" para la identificación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en mezclas, detección de narcóticos, análisis medioambiental, investigación de explosivos e identificación de muestras desconocidas. Además, es capaz de identificar trazas en materiales que se creían que pasaban desapercibidos por otras tecnologías. GC-MS se compone de dos componentes básicos: el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas. El cromatógrafo de gases utiliza una columna capilar que depende de las dimensiones de la columna (longitud, diámetro, grosor de capa) así como las propiedades de fase (p.ej. 5% fenilpolisiloxano). La diferencia de las propiedades químicas de las diferentes moléculas en una mezcla causa que las moléculas sean separadas cuando la muestra cruza la longitud de la columna. Las moléculas necesitan diferentes tiempos (tiempo de retención) para salir (eluir) del cromatógrafo. Eso permite al espectrómetro de masas después de capturar, ionizar, acelerar, desviar y detectar las moléculas ionizadas de forma separada. Para realizar esto, el espectrómetro divide cada molécula en fragmentos ionizados y detecta estos fragmentos mediante su relación masa carga. Estos dos componentes aplicados juntos permiten un grado más fino de identificación de sustancias que cada instrumento utilizado por separado. La combinación de los dos procesos reduce la posibilidad de error ya que es muy poco probable que dos moléculas diferentes se comporten de la misma manera tanto en un cromatógrafo de gases como en un espectrómetro de masas. Por consiguiente, cuando un espectro de masa aparece a un tiempo de retención característico durante un análisis, típicamente lleva a un mayor grado de seguridad que el analito de interés que se encuentra en la muestra (Gutiérrez *et al.*, 2013).

6.-MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Lugar, área de trabajo y período de estudio

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en Monterrey NL, Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango en Gómez Palacio Durango y en el Laboratorio de Etnofarmacología del Centro de Investigación Biomédica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila.

6.2 Recolección de material vegetal

Se realizó una fase previa al diseño experimental para obtener y analizar la información bibliográfica en bases de datos en la red Internet de un grupo de 20 especies de plantas, basadas en la posibilidad de que mostraran actividad antimicrobiana y de esta selección reducir a diez especies para la investigación considerando los siguientes criterios: uso medicinal de la planta y la posibilidad de contener compuestos antibacterianos; presencia de principios activos en las especies seleccionadas; que no se hayan realizado trabajos experimentales en las especies seleccionadas y la distribución geográfica de las plantas (Williamson y Okpako, 1996). En base a los criterios anteriores, las plantas seleccionadas para este estudio fueron: *Tagetes lucida* (Cav), *Leucophyllum frutescens* (Berl.) I.M. Johnston, *Flourensia cernua* (DC), *Acacia farnesiana* (L) Willd, *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth, *Loeselia mexicana* (Lam) Brand, *Euphorbia antisyphilitica* (Zucc), *Phoenix dactylifera* (L), *Agave americana* (L), *Fouquieria splendens* (Engelm). Las plantas se recolectaron frescas en diferentes localidades del área rural de la Comarca Lagunera ubicada entre los Estados de Durango y Coahuila. Los sitios de recolección se ubicaron a una altitud de 1140 metros sobre el nivel del mar. La recolección se realizó durante los meses de mayo de 2010 a septiembre de 2011. Para la recolección se siguieron los lineamientos para las buenas prácticas de recolección vegetal propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS., 2004). La identificación botánica fue

realizada por Eduardo Blanco Contreras, curador botánico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, ubicada en la ciudad de Torreón Coahuila. Se depositó un ejemplar de cada especie en el herbario de la misma universidad.

6.3 Obtención de los extractos metanólicos de las plantas.

Las hojas del material vegetal se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de polvo y partículas extrañas. Se secaron en una estufa a una temperatura de 40°C, después se separaron las hojas y se trituraron en un molino (marca Wiley® modelo 4). Se pesaron 50 g de las hojas trituradas, se colocaron en un matraz Erlenmeyer y se le agregaron 350 mL de metanol (CTR Scientific®), se selló herméticamente, se dejó en agitación constante durante 5 d en un agitador (Dual Action Shaker Lab Line®) para luego filtrar el macerado utilizando papel Whatman No.1 (Whatman International LTD®England) en embudo Buchner y bomba al vacío (Evar® Power Electric México). El solvente se evaporó a presión reducida en un rota evaporador (Büchi® R-205, Switzerland) a 30 rpm y 50°C, el extracto se llevó a sequedad completa (Figura 14) (Rodríguez *et al.*, 2010). El cálculo del rendimiento de la extracción se obtuvo de la siguiente fórmula (García *et al.*, 2010):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{PE}}{\text{PI}} \times 100$$

Dónde:

PE = Peso obtenido después de la extracción

PI = Peso inicial del material vegetal a extraer

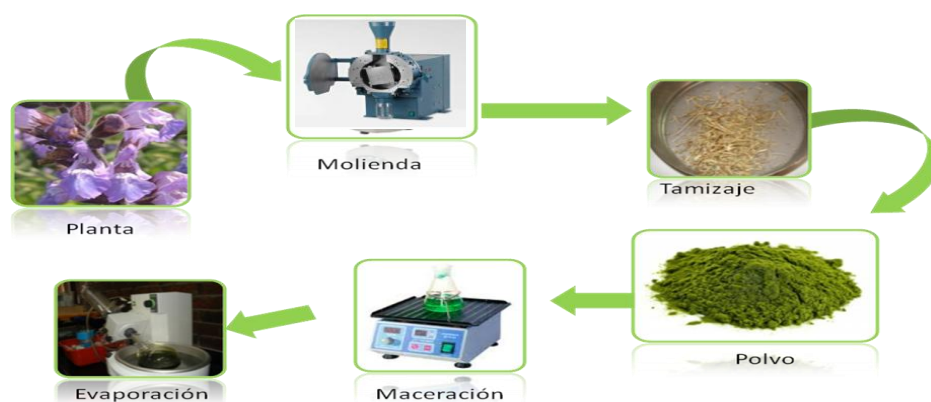


Figura 14. Diagrama de flujo de la extracción metanólica de las especies vegetales.

6.4 Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las plantas en estudio.

6.4.1 Activación de las bacterias.

La identificación y tipificación de la cepa bacteriana se realizó conforme a perfiles bioquímicos y a las recomendaciones del Manual de Microbiología Clínica (Hernández *et al.*, 2003). Todos los aislamientos fueron mantenidos en el medio líquido C Rivas (Rivas *et al.*, 2007). Con los extractos obtenidos se evaluó la actividad biológica sobre los microorganismos mencionados en la Tabla 4.

Tabla 4. Microorganismos utilizados

Bacterias de referencia ATCC	Bacterias de aislados clínicos (AC)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> No 9183	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> No BAA44	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Escherichia coli</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i> 9180	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i> 9235	<i>Proteus vulgaris</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Sarcina lutea</i>
	<i>Streptococcus pyogenes</i>

El método empleado para el ensayo microbiológico fue el de difusión en agar con discos de papel. Para el ensayo microbiológico se vaciaron 5 mL del medio de cultivo en tubos de ensayo de 13x100 mm, se esterilizaron a 120⁰C y 15 Lb/15 min, los tubos se inocularon con la cepa bacteriana y se incubó durante 18-24 h a 37⁰C. El ensayo se realizó por el método de difusión en placa con discos de papel filtro (Hernandez *et al.*, 2003; Winn *et al.*, 2008) para lo cual se utilizó el medio sólido de C. Rivas (Patente IMPI MX/10892). El medio se preparó de acuerdo a instrucciones del fabricante. Para el ensayos de inhibición bacteriana se colocaron 40 µL del extracto metanólico a tres

concentraciones de 1 000, 500 y 250 $\mu\text{g/mL}$ previamente esterilizados por filtración con membranas de 0.25 μm en filtro Milipore®, una vez esterilizadas, cada concentración se impregnaron los discos de papel filtro Whatman No.1 (Whatman® International LTD England) sobre una placa de agar sólido C. Rivas previamente inoculada con 100 μL de una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC ajustada con el Nefelómetro de Mc Farland²⁰. Como control negativo se utilizaron 40 μL de dimetil sulfóxido (DMSO) y como testigo positivo 40 μL de Cefotaxima (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, USA) a las mismas concentraciones que el extracto (Figura 15). Las placas se incubaron en estufa a 37°C por 24 h, se midió el halo de inhibición con Vernier, los resultados de los halos se expresaron en mm (Clinical and Laboratory Institute, 2006).

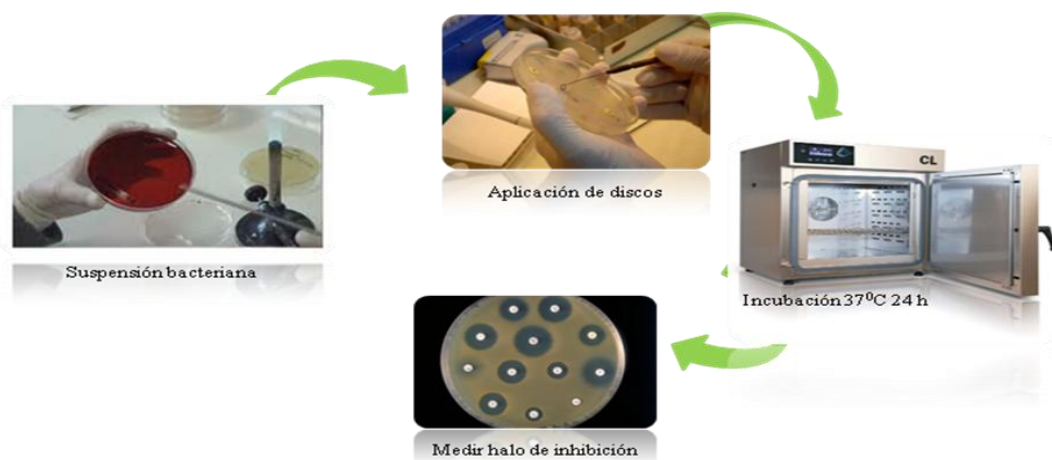


Figura 15. Diagrama de flujo actividad bactericida

6.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos que muestren actividad biológica relevante.

La CMI se realizó por el método de microdilución. El medio usado para las diluciones fue el caldo C. Rivas. En una microplaca de 96 pozos se depositaron 100 μL de medio de cultivo líquido C. Rivas, se le agregaron 50 μL del extracto a las concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8 y 3.9 $\mu\text{g/mL}$, enseguida se adicionaron 100 μL de

la suspensión bacteriana conteniendo un inóculo de 1×10^6 UFC (tubo uno de la escala de Mc Farland). Posteriormente la microplaca se incubó por 24 h a 37°C. Para cada ensayo se utilizó Cefotaxima como testigo positivo a concentración de 500 µg/mL. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para determinar la concentración mínima inhibitoria se adicionaron 10 µL de MTT a una concentración de 2.5 mg/mL a cada pozo, se incubaron por 8 h a 37°C, posteriormente se leyó la absorbancia en un lector de microplacas de ELISA a 570 nm (Dynatech®MR5000) (Figura 16) (NCCLS, 2001; Kakuko *et al.*, 2005; NCCLS, 2002; Escobar *et al.*, 2010).

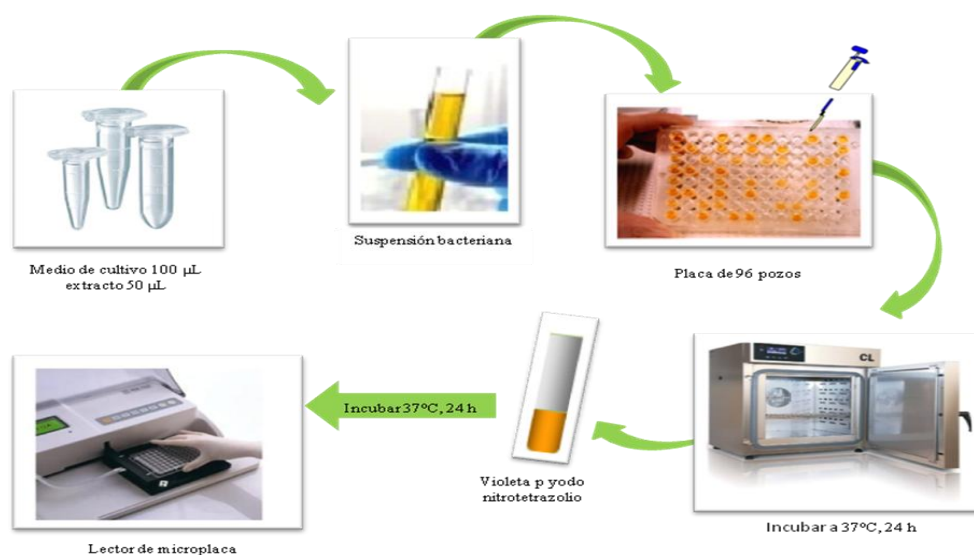


Figura 16. Diagrama de flujo para medir la Concentración Mínima Inhibitoria

6.4.3 Identificación de las fracciones con actividad antibacteriana mediante la técnica de bioautografía.

6.4.3.1 Cromatografía en capa delgada de los extractos que mostraron actividad antibacteriana para identificar las fracciones activas.

Evaluación de las fracciones activas.

Se utilizó la técnica de Hamburger modificada por Verástegui en 1998 la cual puede detectar concentraciones mínimas del compuesto responsable de la actividad biológica y

se observa a simple vista la zona de inhibición. Se utilizaron cromatofolios para cromatografía en capa fina con sílica gel (60W Merck) de 2.5 cm x 8 cm las bandas ya identificadas, se llevaron a esterilidad por luz ultravioleta durante 30 min y se colocaron en cajas de Petri de vidrio previamente estériles. Sobre el cromatograma se colocó una capa de agar C. Rivas de unos 3-5 mm de espesor y se inocularon con una micropipeta agregando 100 μ L del microorganismo ajustado una carga bacteriana de 1×10^6 UFC/mL y se homogenizó con asa de Drigalski. Las condiciones de humedad se mantuvieron colocando dentro de la caja Petri un algodón con agua destilada estéril. Se utilizó como control de crecimiento un cuadro de agar inoculado con el mismo microorganismo pero separado del cromatograma. Las cajas se incubaron a 37 °C por 24 – 48 h. La zona de inhibición de los microorganismos en la tira de agar se midió y se correlacionó con el registro previo de las fracciones separadas cromatográficamente (Figura 17) (Verastegui *et al*, 1998).

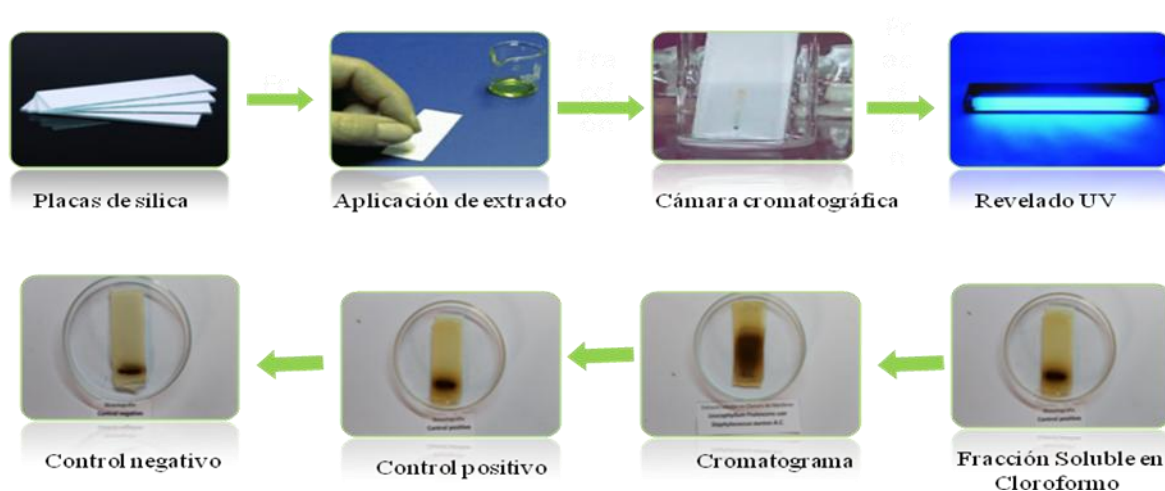


Figura 17. Diagrama de la bioautografía

6.5 Ensayo de Letalidad con larvas de *Artemia salina*

La DL_{50} se define como la concentración de una sustancia o producto derivado de plantas medicinales capaz de matar el 50% de una población expuesta. Para determinar la DL_{50} existen diferentes métodos como lo es el uso de líneas celulares, el empleo de animales de laboratorio o larvas (nauplios) de *Artemia salina*. La ventaja del ensayo de

A. salina, es fácil, rápida y económica (Nguta, 2012), ampliamente utilizada por la Environmental Protection Agency (EPA) de los Estados Unidos como prueba de toxicidad de metales pesados, pesticidas, toxinas en cuerpos de agua y toxicidad de extractos de plantas (Alireza *et al.*, 2010). El procedimiento se describe a continuación: En un recipiente de material acrílico oscuro (eclosionador) se colocaron 300 mL de agua de mar artificial (Coralife Scientific Grand Marine Salt) se adicionaron 0.1 g de huevecillos de *A. salina* (BrineShrimpEggs® San Francisco Bay Brand, Inc.), se incubaron a temperatura ambiente con aireación continua (bomba de acuario ELITE 799) y con luz blanca irradiada de una lámpara de 11 Watts a 20 cm de distancia del eclosionador, finalmente se cerró con la tapa y se incubaron por 48 h para obtener los nauplios. Una vez eclosionados se tomaron 10 nauplios en un volumen de 100 μ L de agua de mar con pipeta Pasteur y se colocaron en una microplaca de 96 pozos, posteriormente se adicionaron 100 μ L de las concentraciones del extracto con 1000, 500, 100 y 10 μ g/mL. Se utilizó como control positivo dicromato de potasio a una concentración de 400 ppm y como control negativo agua de mar. Los nauplios de *A. salina* estuvieron expuestos a las soluciones de extracto durante 24 h bajo las mismas condiciones. Después de este tiempo se contaron los nauplios muertos y vivos con ayuda de un estereoscopio (Iroscope® WB2, EUA), posteriormente se colocaron 50 μ L de etanol (CTR®, Scientific) para inmovilizar al resto de vivos en cada pozo. Se utilizó el método estadístico de Probit para determinar la DL_{50} . El criterio de toxicidad fue que valores de una $DL_{50} > 1000$ μ g/mL se considera no tóxico, $\geq 500 \leq 1000$ μ g/mL, se considera con toxicidad débil y < 200 μ g/mL se considera tóxico (Bastos *et al.*, 2009; Déciga *et al.*, 2007; Molina-Salinas *et al.*, 2006; McLaughlin *et al.* 1998)

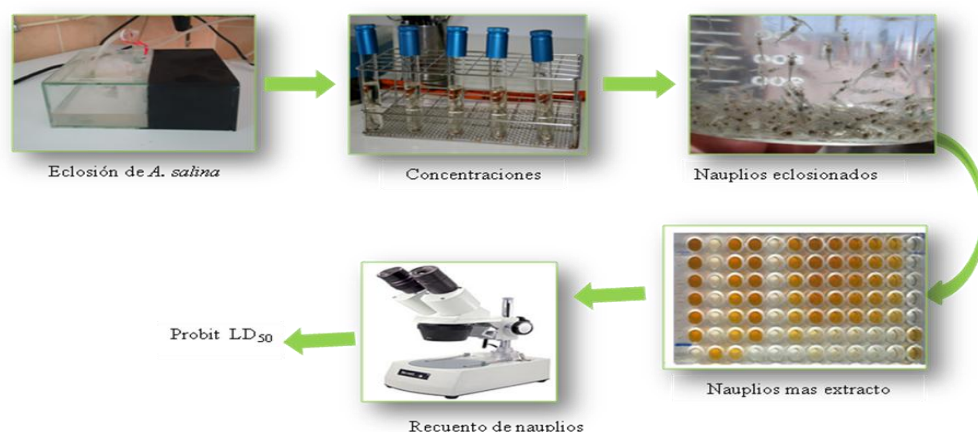


Figura 18. Diagrama del bioensayo de toxicidad con *Artemia salina*

6.6 Determinación de Citotoxicidad en Cultivo Celular

Para evaluar la citotoxicidad de los extractos se empleó la línea celular normal riñón de mono verde africano (VERO). Las células se propagaron en el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Cellgro, Herndon Sigma®) suplementado con 2 mL de glutamina (Sigma®-Aldrich, St. Louis, USA), gentamicina 50 mg (Sigma®-Aldrich, St. Louis, USA) y 10 % de suero fetal bovino (SFB, SIGMA®). Se utilizaron cultivos confluentes (80-90%) de la línea celular, realizando la exclusión con azul de tripano (Sigma®-Aldrich, St Louis, USA) para comprobar su viabilidad se colocaron 3,000 células/pozo en un volumen de 100 µL de medio DMEM en microplacas de 96 pozos (Corning Inc. Costar®), posteriormente se incubaron por 24 h a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂ en incubadora de cultivo (Lab-line Mod 485). Los extractos de *Leucophyllum frutescens* y *Tagetes lucida* se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final de 0.001 µg/mL. Posteriormente se prepararon diluciones de los extractos en DMEM a una concentración final de 3.12, 6.25, 12.0, 25.0, 50.0 y 100.0 µg/mL, se adicionaron 100 µL/pozo de cada dilución, el ensayo se realizó por cuadruplicado. El DMSO se utilizó como control negativo y se evaluó individualmente para citotoxicidad de forma similar a los extractos, las placas se incubaron durante 72 h en atmósfera de 5 % CO₂ a 37 °C. Luego de 72 h se adicionaron 20 µL MTT (sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma®-Aldrich, St Louis, USA). Al cabo de 4 h en atmósfera de 5 % CO₂ a 37 °C se decantó el medio, se adicionaron 200 µL/pozo de DMSO y se leyó la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas de ELISA (Dynatech®MR5000) a 560 nm y 630 nm como referencia (Figura 19). El porcentaje de células muertas se determinó a partir del promedio de las absorbancias obtenidas de controles tratados y no tratados. Se graficaron los valores de concentración de los extractos contra el porcentaje de viabilidad para obtener la IC₅₀. Los valores finales representaron el promedio de dos experimentos por cuadruplicado cada uno. Los valores de absorbancia mostraron una relación lineal con el número de células viables. Se realizó un análisis estadístico utilizando el programa SPSS 17.0 (Kakuko *et al.*, 2005; Umeh *et al.*, 2005; Hamid., 2004; NCCLS, 2001).

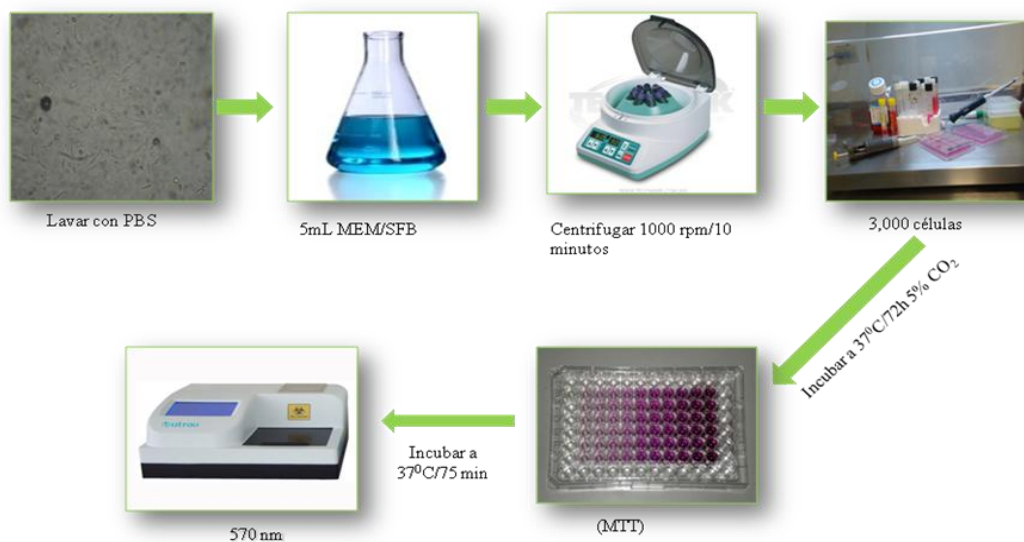


Figura 19. Diagrama de la prueba de citotoxicidad con la línea celular VERO

6.7 Análisis de las fracciones por Cromatografía de Gases acoplado a Masas.

Se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado con un detector de espectro de masas (GC-MS) para identificar los compuestos de las fracciones con efecto inhibitorio sobre los microorganismos en estudio. El análisis se realizó en un equipo HP19091J-433 (Hewlett Packard®, Abonadle, PA.) GC-MS Agilent 5973 utilizando columnas HP 5.

6.8 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar (DE) de ensayos independientes con 3 réplicas. Las comparaciones de las medias del efecto de inhibición de la concentración del extracto sobre las bacterias en estudio se hicieron mediante la prueba *t de Student*, considerando como control el antibiótico cefotaxima. Para los ensayos de inhibición del crecimiento se utilizó un modelo bivariado de regresión lineal para el extracto y bacteria en estudio considerando la dosis inhibitoria. Se utilizó el

paquete estadístico STATA versión 11.0 (Stata Corporation, Texas, USA) considerando la diferencia estadística significativa a una $p < 0.05$.

Para el ensayo de letalidad con *A. salina*, la DL_{50} se calculó con el paquete estadístico Probit. La CMI se obtuvo con el Paquete estadístico STATA versión 11.0 (Corporation, Texas, USA) calculando la tendencia de los datos con Probit. Los valores de IC_{50} (citotoxicidad) del extracto se determinaron a partir de las curvas de concentración-efecto (número de células) mediante el análisis de regresión lineal utilizando el paquete estadístico SPSS versión 15.

7.- RESULTADOS

7.1 Recolección e identificación del material vegetal de estudio.

Las especies vegetales se recolectaron en la zona rural de los poblados de Tlahualilo, Nazas, Viesca y San Pedro ubicados en el semidesierto Chihuahuense que comprende la Región Lagunera en el Norte de México a una altitud de 1400 msn. En la tabla 5 se registra el número de Voucher de los ejemplares vegetales.

Tabla 5. Identificación taxonómica de las especies vegetales estudiadas

Nombre científico	Nombre común	Registro de Voucher
<i>L. frutescens</i>	Cenizo	UAAANL007/2012
<i>Tagetes lucida</i>	Hierbanís	UAAANL008/2012
<i>F. splendens</i>	Ocotillo	UAAANL009/2012
<i>F. cernua</i>	Hojasén	UAAANL012/2013
<i>E. antisiphylitica</i>	Candelilla	UAAANL010/2012
<i>L. mexicana</i>	Espinosilla	UAAANL013/2013
<i>A. americana</i>	Maguey	UAAANL014/2013
<i>A. farnesiana</i>	Huizache	UAAANL011/2012
<i>Tecoma stans</i>	Tronadora	UAAANL015/2013
<i>Phoenix dactilyfera</i>	Palma datilera	UAAANL016/2013

7.2 Rendimiento de los extractos metanólicos

En la Tabla 6 se muestran los porcentajes de los rendimientos de la extracción metanólica de las plantas en estudio. Las hojas de *L. frutescens* presentaron el mayor rendimiento con 17.2% y el extracto con menor rendimiento fue el de las hojas de *Agave americana* con tan solo 1.8%.

Tabla 6. Rendimiento de los extractos metanólicos de especies vegetales recolectadas en el semidesierto Chihuahuense.

Planta (hojas)	Peso seco (g)	Rendimiento (%)
<i>Leucophyllum frutescens</i>	50.0	17.2
<i>Acacia farnesiana (flor)</i>	25.0	3.7
<i>Fouquieria splendens</i>	50.0	8.2
<i>Euphorbia antisifilitica</i>	100.0	10.0
<i>Tecoma stans</i>	50.0	6.5
<i>Tagetes lucida</i>	60.0	4.2
<i>Agave americana</i>	60.0	1.8
<i>Phoenix dactilyfera</i>	60.0	4.8
<i>Flourenzia cernua</i>	50.0	11.1
<i>Loeselia mexicana</i>	100.0	10.0

7.3 Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las plantas.

Los extractos metanólicos de las plantas se sometieron a la determinación de la actividad antibacteriana utilizando ocho cepas patógenas obtenidas de aislados clínicos y cinco cepas de referencia (ATCC) (Tabla 4). Los resultados de la actividad biológica de las diez plantas utilizadas con las trece cepas bacterianas se escriben en las tablas (7,8,9,10,11,12).

Tabla 7. Actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales en estudio de Norte de México contra cepas bacterianas de referencia ATCC mediante el método de difusión en disco en agar.

Planta	Microorganismos				
	<i>K. pneumoniae</i> No 9183	<i>S. aureus</i> No BAA44	<i>E. coli</i> O157	<i>E. aerogenes</i> 9180	<i>E. cloacae</i> 9235
<i>L. frutescens</i>	+	+++	++	-	+
<i>T. lucida</i>	-	-	-	-	+
<i>F. splendens</i>	-	-	++	-	-
<i>F. cernua</i>	++	-	++	+	+
<i>E. antisiphylitica</i>	-	-	++	++	-
<i>L. mexicana</i>	-	-	-	-	-
<i>A. americana</i>	-	-	-	-	+
<i>A. farnesiana</i>	-	-	-	-	-
<i>T. stans</i>	-	++	-	-	-
<i>P. dactilyfera</i>	-	-	++	-	-

Escala: débilmente activos 5-10 mm (+), medianamente activos 11-15 mm (++), altamente activos > de 15 mm (+++) según el criterio de García Hernández *et al.*, 2006.

Tabla 8. Actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales en estudio del Norte de México contra cepas bacterianas de aislados clínicos (AC) mediante el método de difusión en disco en agar.

Planta	Microorganismos							
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. lutea</i>	<i>St. pyogenes</i>
<i>L. frutescens</i>		+++	-	-	-	-	-	-
<i>T. lucida</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>F. splendens</i>	++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>F. cernua</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. antisiphylitica</i>	-	++	-	-	-	-	-	-
<i>L. mexicana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. americana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. farnesiana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. stans</i>	-	+++	-	-	-	-	-	-
<i>P. dactilyfera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

-
Escala: débilmente activos 5-10 mm (+), medianamente activos 11-15 mm (++), altamente activos > de 15 mm (+++) según el criterio de García Hernández *et al.*, 2006

TABLA 9. Actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales que mostraron inhibición sobre *S. aureus* (AC).

Planta	Concentración µg/mL / halo de inhibición (mm)		
	250 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
<i>L. frutescens</i>	10	12	12
<i>T. stans</i>	12	15	15
<i>F. splendens</i>	12	15	15
<i>E. antisiphylitica</i>	10	10	12
<i>T. lucida</i>	10	10	10
Cefotaxima	15	15	15
DMSO	0	0	0

AC, cepa de aislado clínico; DMSO, dimetil sulfóxido (control negativo); cefotaxima, control positivo.

Tabla 10. Actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales que mostraron inhibición sobre *E. coli* ATCC O157.

Planta	Concentración µg/mL / halo de inhibición (mm)		
	250 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
<i>L. frutescens</i>	10	12	12
<i>F. splendens</i>	12	15	15
<i>P. dactylifera</i>	12	15	15
<i>F. cernua</i>	10	10	12
Cefotaxima	15	15	15
DMSO	0	0	0

ATCC, American type culture collection; DMSO, dimetil sulfóxido (control negativo); cefotaxima, control positivo.

Tabla 11. Actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales que mostraron inhibición sobre *Enterobacter aerogenes* ATCC 9183.

Planta	Concentración µg/mL / halo de inhibición (mm)		
	250 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
<i>F. cernua</i>	10	10	12
<i>E. antisiphylitica</i>	10	15	15
Cefotaxima	15	15	15
DMSO	0	0	0

ATCC, American type culture collection; DMSO: dimetil sulfóxido (control negativo); cefotaxima (control positivo).

7.4 Actividad antibacteriana

Los extractos metanólicos de *L. frutescens*, *T. stans*, *F. splendens*, *E. antisiphylitica* y *T. lucida* mostraron actividad antibacteriana a las tres concentraciones de 250, 500 y 1000 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* (AC) (Tabla 9). De acuerdo al análisis estadístico para *L. frutescens*, *T. stans*, *F. splendens*, *E. antisiphylitica* y *T. lucida*, por cada microgramo del extracto aplicado se observó un efecto inhibitorio de 0.114, 0.942, 0.28, 1.8 y 0.37 cm respectivamente. Al comparar las medias del efecto de inhibición y la concentración aplicada sobre el cultivo bacteriano considerando como referencia el control positivo el antibiótico cefotaxima empleando la prueba *t-Student* resultando una $p < 0.01$, 0.03, 0.02, 0.12 y 0.03 respectivamente, lo cual se considera significativa.

Los extractos de *L. frutescens*, *F. splendens*, *P. dactylifera* y *F. cernua* mostraron actividad antibacteriana relevante a las tres concentraciones de 250, 500 y 1000 µg/mL sobre *Escherichia coli* 0157 (Tabla 10). De acuerdo al análisis estadístico, para *L. frutescens*, *F. splendens*, *P. dactylifera* y *F. cernua* por cada microgramo del extracto aplicado se observó un efecto inhibitorio de 0.28, 0.37, 0.142 y 0.65 cm respectivamente. Al comparar las medias del efecto de inhibición y la concentración aplicada sobre el cultivo bacteriano considerando como referencia el control positivo, empleando la prueba *t-Student* se observó una $p < 0.01$, 0.02, 0.01 y 0.01 respectivamente, lo cual se considera significativa.

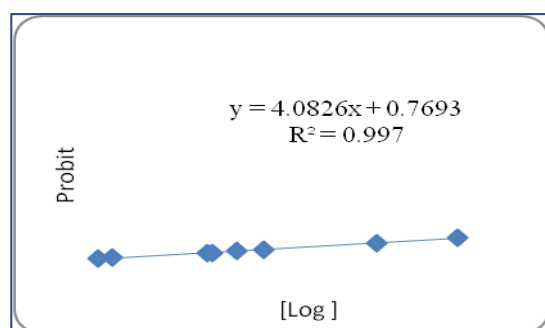
F. cernua y *E. antisiphylitica* a las tres concentraciones de prueba mostraron actividad antibacteriana contra las cepa de referencia *Enterobacter aerogenes* 9183 (Tabla 11). De acuerdo al análisis estadístico, para *F. cernua* y *E. antisiphylitica* por cada microgramo del extracto aplicado se observó un efecto inhibitorio de 0.37 y 0.5 cm respectivamente. Al comparar las medias del efecto de inhibición y la concentración aplicada sobre el cultivo bacteriano considerando como referencia el control positivo, empleando la prueba *t-Student* se observó una $p < 0.01$, 0.06 respectivamente, lo cual se considera significativa para *F. cernua*, no así para *E. antisiphylitica*.

A excepción de *A. farnesiana* y *L. mexicana* el resto de las especie probadas, mostraron actividad antibacteriana.

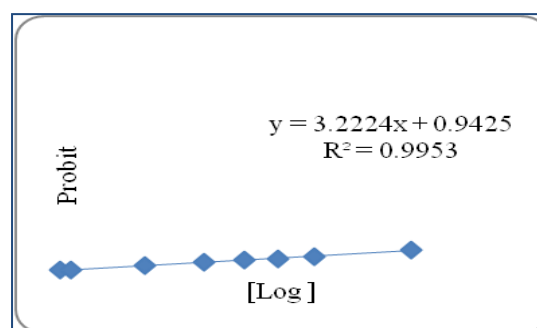
La actividad antibacteriana mostrada fue lineal en función de la concentración de los extractos. Bacterias que no mostraron actividad antibacteriana: *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* y *E. coli* (AC).

7.4.1. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los extractos que mostraron mayor actividad biológica

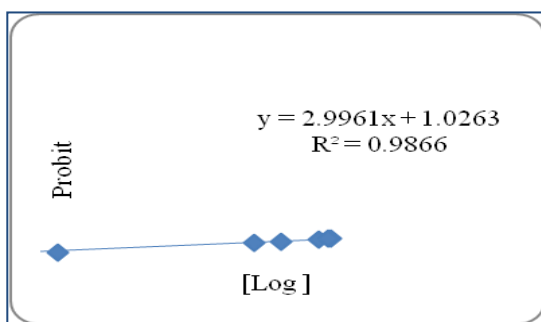
Una vez obtenidos los extractos metanólicos de las especies vegetales que mostraron actividad antimicrobiana significativa se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) sobre las bacterias de estudio como se describió en la estrategia experimental. El cálculo de la CMI de los extractos se obtuvo a través del análisis Probit, empleando la ecuación $Y = mx + b$ (Gráficas 1 – 10).



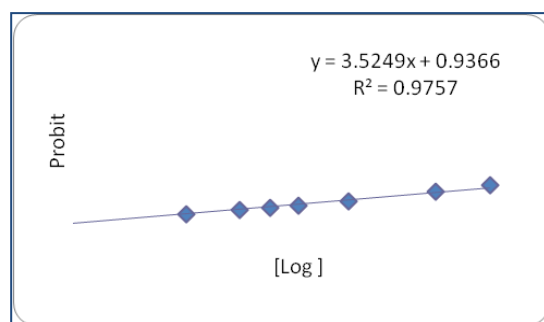
Gráfica 1. Diagrama de dispersión de las variables Y_i Probit y $\log X_i$ del extracto de *L. frutescens* sobre *S. aureus*



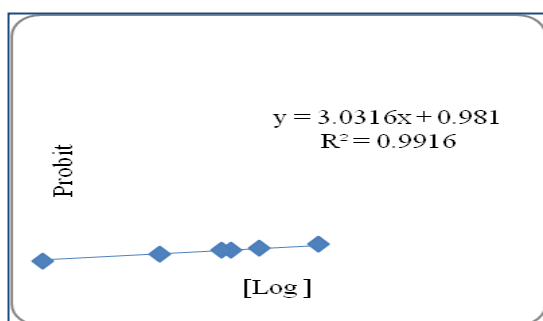
Gráfica 2. Diagrama de dispersión de las variables Y_i Probit y $\log X_i$ del extracto de *T. stans* sobre *S. aureus*



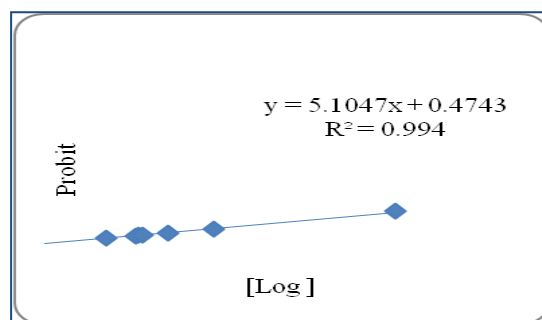
Gráfica 3. Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de *F. splendens* sobre *S. aureus*



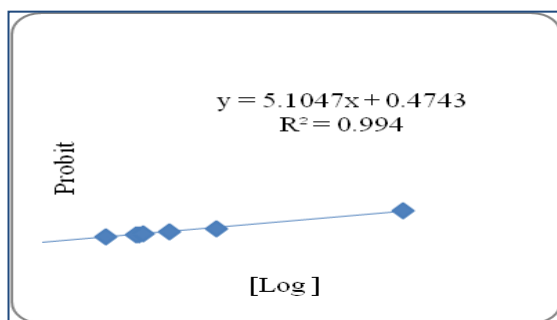
Gráfica 4. Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de *T. lucida* sobre *S. aureus*.



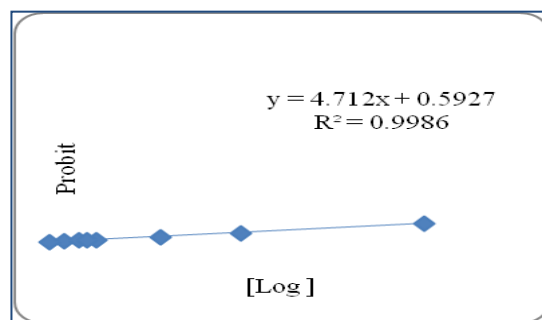
Gráfica 5. Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de *E. antisyphilitica* sobre *S. aureus*



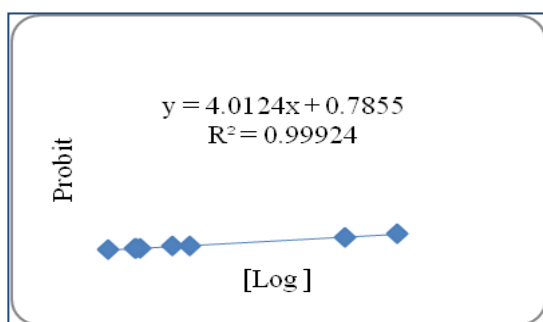
Gráfica 6. Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de *T. lucida* sobre *E. cloacae* (referencia)



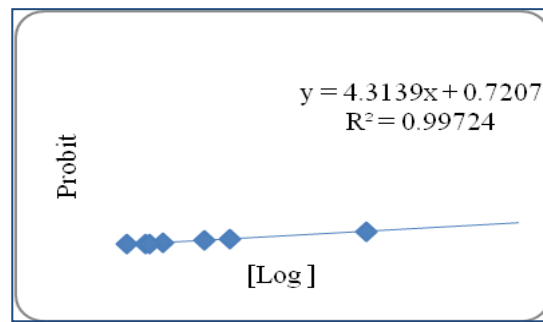
Gráfica 7. Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de *A. americana* sobre *E. cloacae* (referencia)



Gráfica 8. Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de *F. cernua* sobre *E. cloacae* (referencia)



Gráfica 9. Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de *F. cernua* sobre *E. coli* O157



Gráfica 10. Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de *L. frutescens* sobre *E. coli* O157

En la Tabla 12 se muestran los resultados de la MIC de los extractos metanólicos con mayor actividad biológica, los extractos que tuvieron mejor actividad fueron los de *T. lucida* con una MIC de 23.0 µg/mL y *F. splendens* 25.0 µg/mL sobre *S. aureus*.

Tabla 12. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos metanólicos de las especies en estudio.

Especie vegetal	Concentración Mínima Inhibitoria µg/mL							
	<i>E. aerogenes</i> ATCC 9183		<i>E. cloacae</i> ATCC 9235		<i>S. aureus</i> (AC)		<i>E. coli</i> ATCC O157	
<i>L. frutescens</i>					25.4		30.0	
<i>T. stans</i>					36.1			
<i>F. splendens</i>					25.0		27.1	
<i>E. antishypilitica</i>	30.1				26.8			
<i>T. lucida</i>			32.6		23.0			
<i>P. dactylifera</i>							34.0	
<i>F. cernua</i>			29.2					
<i>A. americana</i>			33.0					
ATCC:American	type	culture	collection;	AC,	aislado	clínico		

7.5 Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*

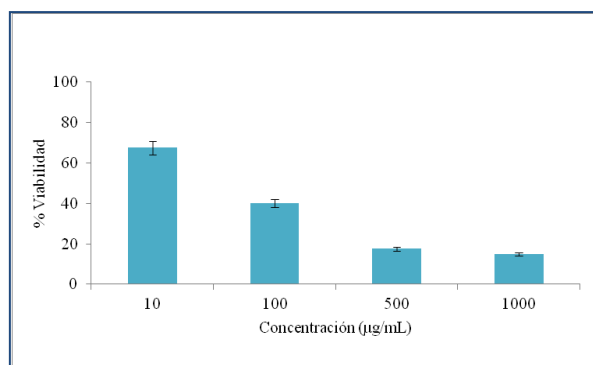
Con el propósito de determinar la Dosis Letal Media (DL₅₀) de cada uno de los extractos, se diseñó el experimento en base al análisis Probit con el programa SPSS versión 17. Para evaluar la actividad tóxica se adicionaron 100 µL de las diluciones de los extractos a probar las concentraciones probadas estuvieron en un rango de 10 a 1000 µg/mL. En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos para la actividad de letalidad sobre *A. salina* para cada uno de los extractos. Los extractos no mostraron actividad tóxica sobre *A. salina*, debido a que la DL₅₀ resultó > 1000 µg/mL excepto en el extracto de cenizo que resultó tóxico.

Tabla 13. Actividad de los extractos metanólicos sobre la letalidad en nauplios de *Artemia salina*.

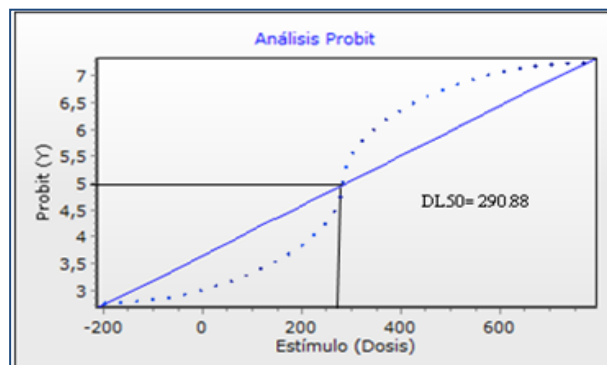
Extracto metanolico	DL ₅₀ (µg/mL)	X ²	P
<i>E. antisiphylitica</i>	2,733.10	1.24	0.536
<i>A. farnesiana</i>	1,088.66	14.59	0.0007
<i>L. frutescens</i>	290.88	97.1	0.0
<i>P. dactylifera</i>	2,599.70	0.25	0.878
<i>L. mexicana</i>	671.69	8.56	0.013
<i>T. stans</i>	845.91	28.08	0.0
<i>F. splendens</i>	2,651.85	2.638	0.62
<i>T. lucida</i>	603.1	8.12	0.043
<i>F. cernua</i>	852.45	26.25	0.0
<i>A. americana</i>	763.58	24.03	0.0

Valor de la DL50 de los extractos contra *A. salina*, mediante el diseño estadístico Probit, mostrando el valor de la X2 (Chi-cuadrada) y (P) la significancia de los resultados obtenidos con el paquete SSPS v 17.

Según los resultados obtenidos, el extracto de *Leucophyllum frutescens* resultó tóxico sobre *A. salina* a las concentraciones probadas, con una LD₅₀ de 290.88 µg/mL (Figura 11) bajo el criterio de Déciga (2010). El porcentaje de viabilidad del extracto a una concentración de 500 µg/mL sobre *Artemia salina* fue de 10% y no hubo nauplios sobrevivientes a 1000 µg/mL (Figura 12).

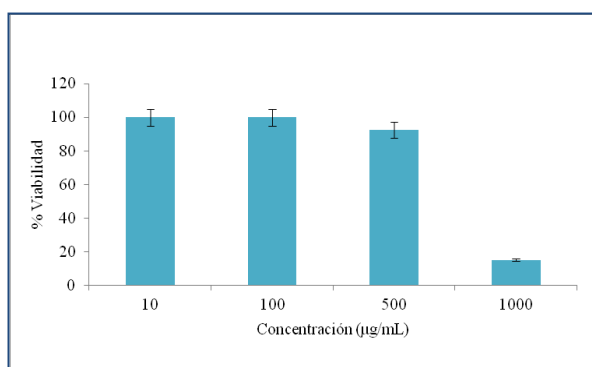


Gráfica 11. Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de *L. frutescens*

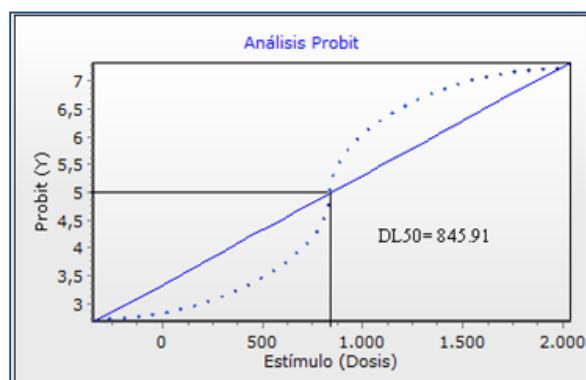


Gráfica 12. DL₅₀ de extracto metanólico de *L. frutescens* sobre *A. salina*

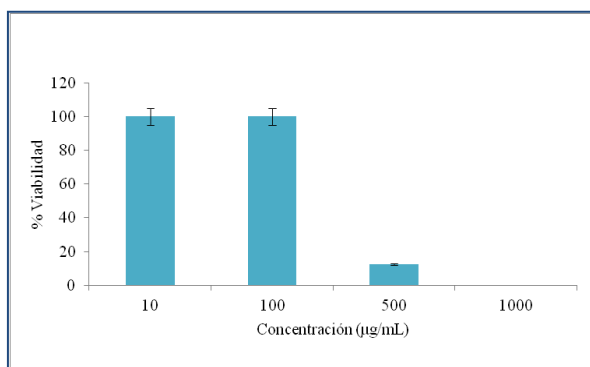
De acuerdo a los resultados obtenidos. mostrados en las Figuras 13-30, los extractos no son tóxicos sobre *A. salina* a las diferentes concentraciones probadas.



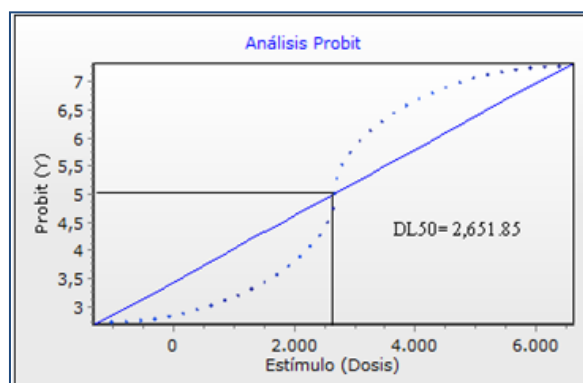
Gráfica 13. Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de *T. stans*



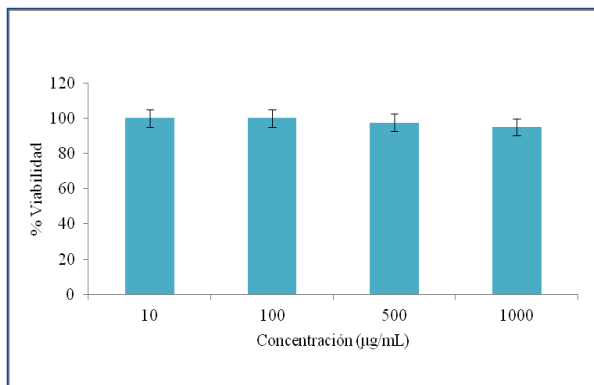
Gráfica 14. DL₅₀ del extracto metanólico de *T. stans* sobre *A. salina*



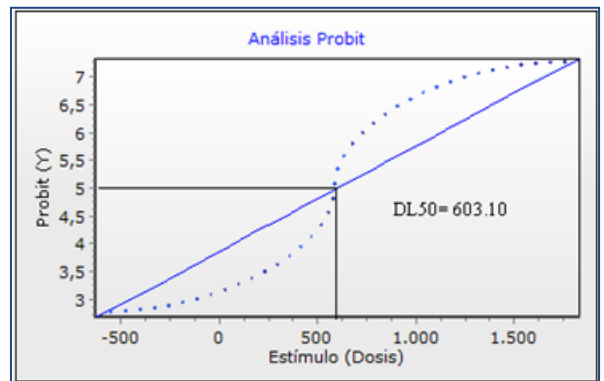
Gráfica 15. Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de *F. splendens*



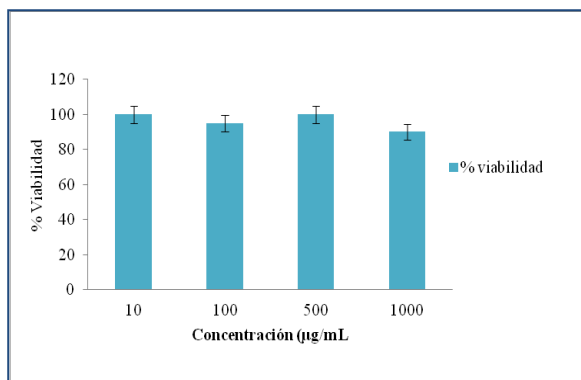
Gráfica 16. DL₅₀ del extracto metanólico de *F. splendens* sobre *A. salina*



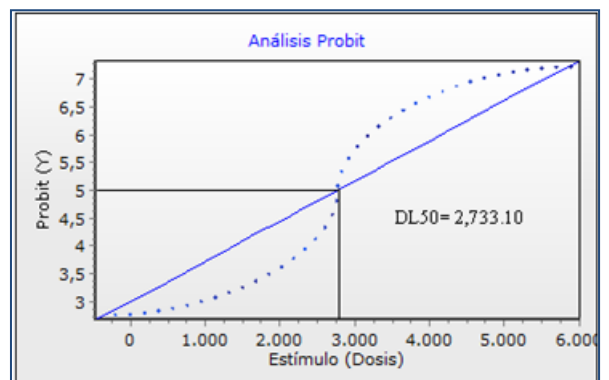
Gráfica 17. Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de *T. lucida*



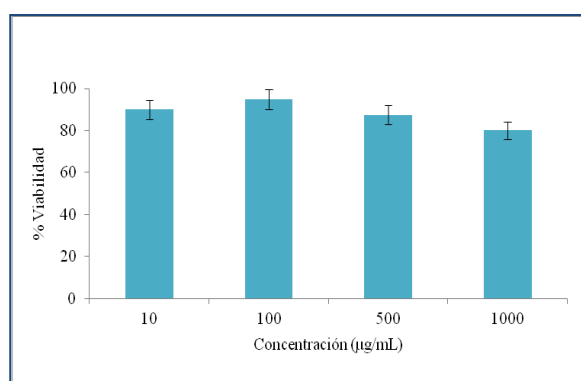
Gráfica 18. DL₅₀ del extracto metanólico de *T. lucida* sobre *A. salina*



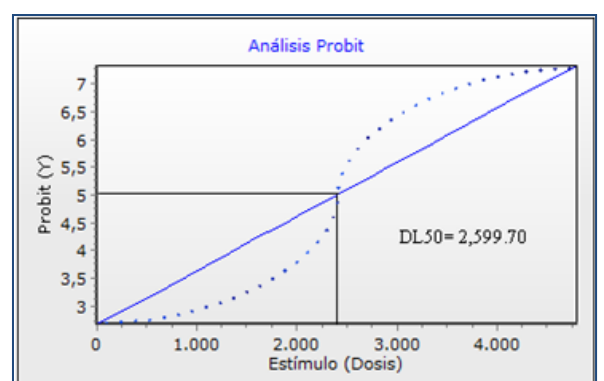
Gráfica 19. Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de *E.antisiphylitica*



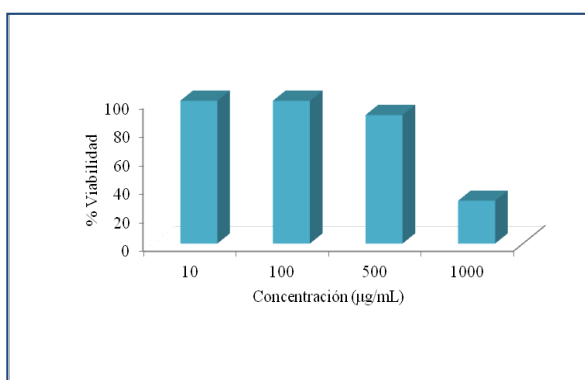
Gráfica 20. DL₅₀ del extracto metanólico de *E.antisiphylitica* sobre *A. salina*



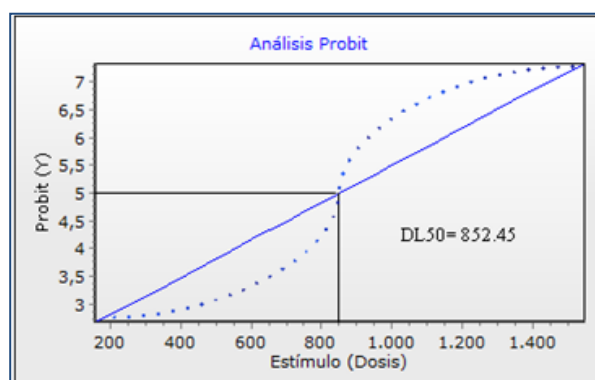
Gráfica 21. Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de *P. dactylifera*



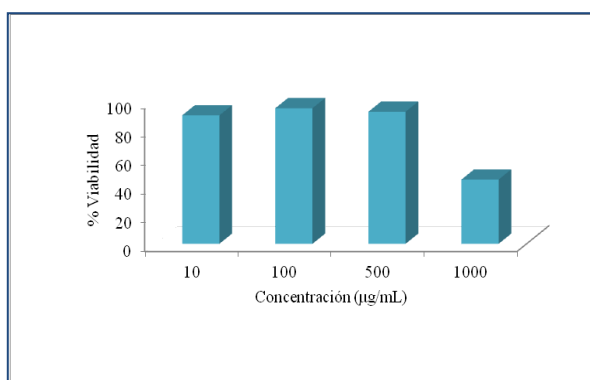
Gráfica 22. DL₅₀ del extracto metanólico de *P. dactylifera* sobre *A. salina*



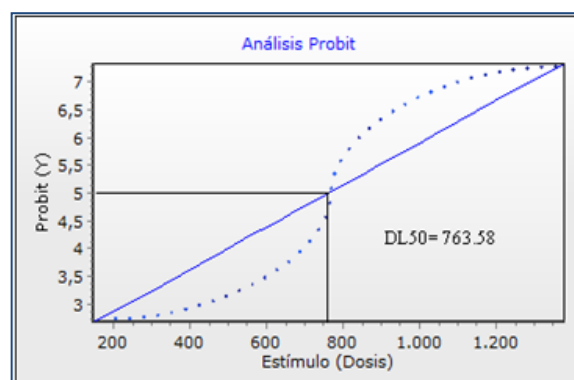
Gráfica 23. Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de *F.cernua*



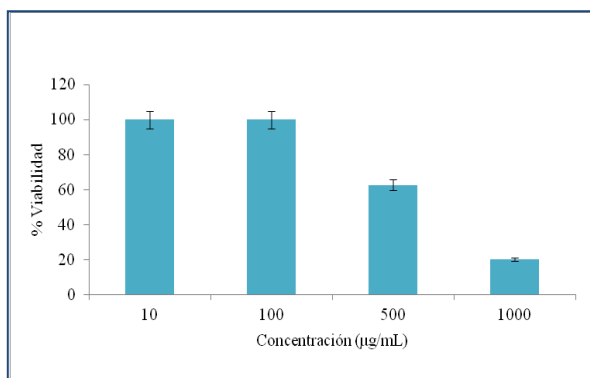
Gráfica 24. DL₅₀ del extracto metanólico de *F.cernua* sobre *A. salina*



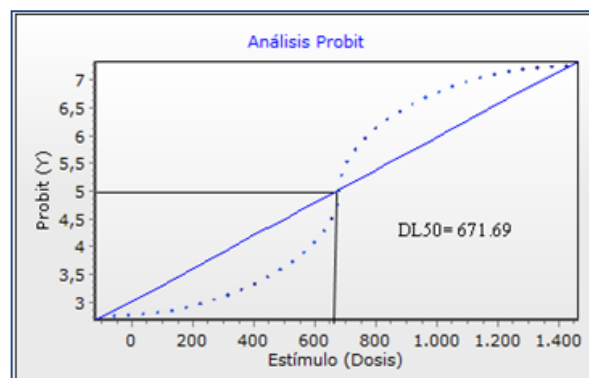
Gráfica 25. Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de *A. americana*



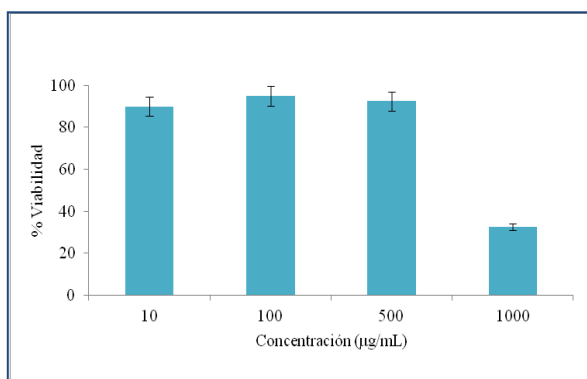
Gráfica 26. DL₅₀ del extracto metanólico de *A. americana* sobre *A. salina*



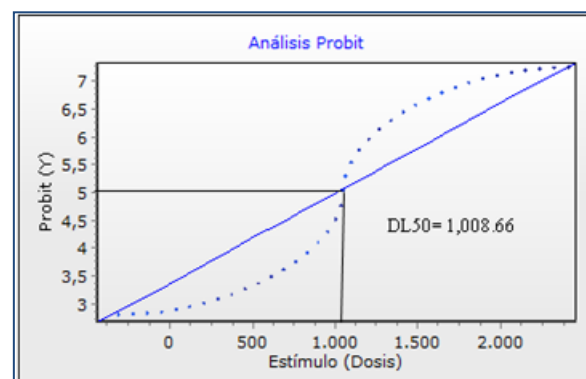
Gráfica 27. Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de *L.mexicana*.



Gráfica 28. DL₅₀ del extracto metanólico de *L. Mexicana* sobre *A. salina*



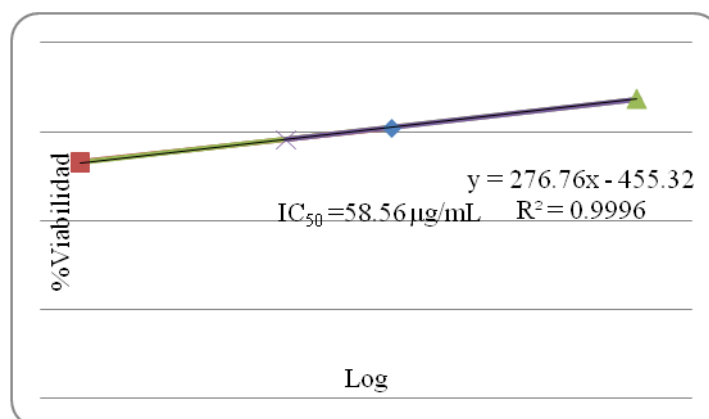
Gráfica 29. Porcentaje de viabilidad del extracto metanólico de *A. farnesiana* sobre *A. salina*



Gráfica 30. DL_{50} del extracto metanólico de *A. farnesiana* sobre *A. salina*

7.6 Citotoxicidad de los extractos sobre la línea celular VERO.

Se evaluó el efecto citotóxico del extracto de *L. frutescens* y *T. lucida* sobre el criterio de que con la prueba de *A. salina* *L. frutescens* mostró una DL_{50} de 290.58 µg/mL. Además se probó *T. lucida* con el criterio de que analizando los datos de mortalidad con el paquete estadístico de la EPA (Environmental Protection Administration) resultó con una DL_{50} 33.1 µg/mL, dato diferente al que se obtuvo con el paquete SPSS. Se utilizó la línea celular VERO, utilizando el reactivo MTT que mide la capacidad metabólica de la célula como indicativo de daño citotóxico, encontrándose un índice de toxicidad media (CI_{50}) del extracto de *L. frutescens* de 58.56 µg/mL (Figura31). El análisis estadístico se realizó mediante regresión lineal con el programa SPSS versión 17. El extracto de *T. lucida* resultó con un CI_{50} de 56 µg/mL.



Gráfica 31. IC_{50} del extracto metanólico de hojas de *L. frutescens* sobre la línea celular VERO.

7.7 Actividad Antimicrobiana mediante el método de Bioautografía.

Separación preliminar de los compuestos por cromatografía en capa fina.

Previo a la cromatografía, el extracto de *L. frutescens* se sometió a una partición con cloruro de metileno. Se montaron los cromatofolios para cromatografía en capa fina con sílica gel (60W Merck) en portaobjetos de 2.5 cm x 8 cm para separar las fracciones de los extractos activos de las especies vegetales en estudio. El eluyente empleado fue una mezcla benceno-acetona 8:2. Se observaron tres bandas cromatográficas (Figura 41).

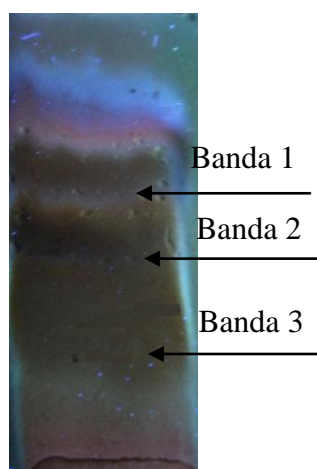


Figura 20. Fraccionamiento de la extracción clorofórmica de *L. frutescens*

En la Tabla 14 se observan los (R_f) de las bandas obtenidas de la fracción clorofórmica de *L. frutescens* reveladas a la luz UV y con cloruro de cobalto las cuales se separaron con mejor resolución con el eluyente Benceno-Acetona (8:2).

Tabla 14. Bandas obtenidas de la fracción clorofórmica de *L. frutescens* reveladas a la luz UV y CoCl_2 eluyente Benceno-Acetona (8:2).

Fracción	R_f	Luz UV	Cloruro de Cobalto
1	0.4	Café	Café
2	0.5	Café	Café
3	0.6	Café	Café

7.8 Bioautografía

Es una técnica sencilla y rápida que combina las ventajas de la cromatografía en capa fina y la detección de actividad antimicrobiana. Los resultados obtenidos, nos condujeron a seleccionar las plantas con actividad antibacteriana y proseguir con el estudio fitoquímico biodirigido, para aislar e identificar parcialmente los compuestos responsables de la actividad. Las diez plantas estudiadas que mostraron mayor actividad antibacteriana se particionaron con cloruro de metileno y se les realizó el estudio de bioautografía, resultando solo la especie de *L. frutescens* activa contra *S. aureus* (AC) figura 42., la cual en la cromatografía de capa fina se observaron tres bandas cromatográficas de compuestos químico activos. Los compuestos químicos aislados conservaron la actividad antibacteriana obtenida con el extracto crudo



Figura 21. Inhibición sobre *S. aureus* por bioautografía

7.9 Resultados del análisis cromatográfico de *L. frutescens*

Análisis por cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS).

La fracción clorofórmica del extracto de *L. frutescens* se sometió a análisis cromatográfico debido a que resultó activo en el ensayo de autobiografía. El extracto de *L. frutescens* se solubilizó con cloruro de metileno y se sometió al análisis de GC-MS para la identificación de compuestos. En la Figura 43 se muestra el espectro en el que se observan nueve señales, identificando el pico más alto con tiempo de retención (TR) de 27.8 unidades, se propone que el compuesto corresponde al ácido homovanílico metil ester, la cual se identificó con un 64 % de certeza de acuerdo a la librería Wiley 7n.1 de la base de datos del equipo (HP19091J-433 Hewelwt Packard,

Abonadle, PA). En la Tabla 15 se observan los tiempos de retención (TR), certeza e identificación de los espectros obtenidos del análisis espectroscópico del extracto de *L. frutescens*.

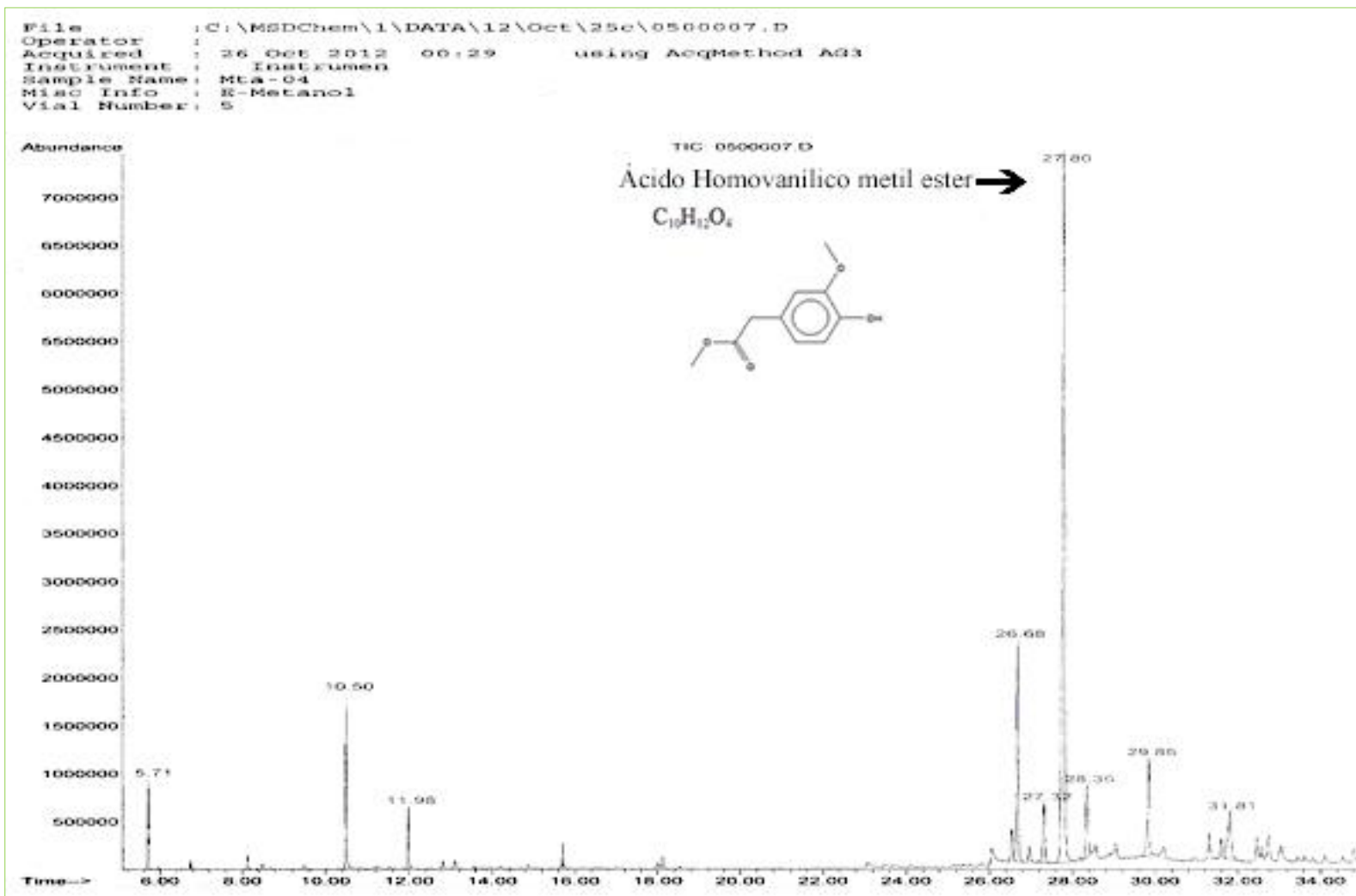


Figura 22. Cromatograma del extracto metanólico de *L. frutescens*

Tabla 15. Tiempos de retención (TR), certeza y compuesto probable de los espectros obtenidos del análisis espectroscópico del extracto de *L. frutescens*

Muestra	Tiempo de retención (TR)	Certeza (%)	Compuesto
Extracto de <i>L. frutescens</i>	5.71	94	Acido benzoico metil ester
	10.50	95	Acido parabenzoico p-hidroxy-metil ester
	11.98	91	Acido benzenopropanoic4-hidroxi metil ester
	26.68	38	-----
	27.32	83	Dihidroxicaroteno-8,8-dial (5)
	27.80	64	Acido bencenacético,4-hiroxi-3.metoxy-metil ester
	28.35	----	-----
	29.85	----	-----
	29.85	----	-----
	31.81	----	-----

8.- DISCUSIÓN

Desde hace décadas, el empleo de plantas medicinales y de los productos derivados de las mismas está aumentando de manera importante. Esto se debe a una serie de factores, entre los cuales debemos destacar en muchos casos el conocimiento preciso de la composición química y del hecho de que en la actualidad dicha utilización se fundamenta en numerosos ensayos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*, así como en la determinación fitoquímica. De esta manera, el uso de las especies vegetales medicinales que se ha venido haciendo en forma empírica y basada en la tradición tiene hoy una base científica con nuevas herramientas analíticas (Araujo *et al.*, 2004). Hay pocos datos en la literatura que reporten la actividad antimicrobiana de las plantas nativas del Norte de México (Salazar-Aranda *et al.*, 2011). Las plantas evaluadas en este estudio se seleccionaron bajo tres de los cinco criterios propuestos por Williamson *et al* (1996), por sus características etnofarmacológicas, por su distribución en el semidesierto del Norte de México, y por antecedentes de actividad antimicrobiana en diferentes especies bacterianas. Se utilizó metanol en el proceso de maceración porque otros autores lo han utilizado ampliamente y han obtenido mejor actividad antimicrobiana que con otros solventes (Parekh *et al.*, 2006; Singh., 2012; Rojas *et al.*, 2006).

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de *L. frutescens*, *T. stans*, *F. splendens*, *T. lucida*, *E. antisiphylitica*, *P. dactylifera*, *A. americana*, *F. cernua*, *A. farnesiana*, *L. mexicana* sobre cinco cepas de referencia y ocho cepas bacterianas de aislados clínicos con el antecedente de haber sido obtenidas de pacientes internados en Hospital Infantil Universitario de la ciudad de Torreón Coahuila.

Los extractos de *L. frutescens*, *T. stans*, *F. splendens*, *T. lucida* y *E. antisiphylitica* fueron más activos que los restantes cinco con la mayoría de los organismos estudiados, especialmente contra *S. aureus* de aislado clínico. Las bacterias que no presentaron actividad antibacteriana: *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* y *E. coli* (AC). Previamente se mencionó que hay pocos estudios reportados sobre la actividad antimicrobiana con plantas del Norte de Mexico. Uno de ellos es el de

Verástegui *et al.* (1998) en el que usaron extractos etanólicos de tres plantas del desierto Chihuahuense, en ese estudio reportaron actividad antibacteriana contra 50% de los organismos probados, a diferencia de los resultados obtenidos con las plantas evaluadas en el presente trabajo las cuales no mostraron actividad sobre cepas gram negativas de aislados clínicos.

En este trabajo se encontró actividad antibacteriana con cinco extractos de las plantas sobre *S. aureus* (AC), en donde se observó actividad relevante de *Leucophyllum frutescens*; de la misma manera, un reporte de Molina-Salinas *et al.* (2007) encontraron actividad antibacteriana en cepas de *S. aureus* (AC) y cepas multiresistentes de *M. tuberculosis*, *H. influenzae* tipo b. con el extracto metanólico de *Leucophyllum frutescens* recolectado al Norte de México.

En este trabajo se reporta la inhibición de *S. aureus* con *T. lucida*, en cambio no se observó actividad con bacterias Gram negativas. En cambio, Céspedes *et al.* (2006) reportaron que el extracto metanólico de *Tagetes lucida* recolectada en el Norte de México, inhibió el crecimiento de *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella sp.* y *Shigella sp.*

Los resultados con el extracto metanólico de *L. mexicana* no mostraron inhibición. En las cepas estudiadas, similar al estudio realizado por Navarro *et al.* (2006), con la misma especie vegetal no observaron actividad bacteriana.

El extracto metanólico de *A. americana* solo mostró actividad con *E. cloacae* (CR); Khan *et al.* (2010) reportaron que el extracto etanólico de *A. americana* presentó actividad antibacteriana contra *S. aureus*, a diferencia de los resultados obtenidos en esta investigación, la cual no mostró actividad sobre esta especie bacteriana.

Con respecto a la especie vegetal *Phoenix dactylifera*, Perveen *et al.* (2012) el extracto metanólico inhibió el crecimiento de *E. coli* (CR), el análisis de estos resultados no se pudieron contrastar debido a la escasa información en la literatura sobre la actividad antibacteriana. Kahkashan *et al.* (2012) evaluaron *Phoenix dactylifera* contra bacterias Gram positivas y negativas de aislados clínicos, ellos encontraron que el extracto metanólico mostró buena actividad antibacteriana contra *E. coli* se puede decir que los resultados fueron similares a los de este trabajo.

Ruiz *et al.* (2009) evaluaron la actividad antimicrobiana y antifúngica del extracto metanólico con seis plantas medicinales mexicanas *Amphypteringium adstrigens*,

Castella tortuosa, *Coutarea latiflora*, *Ibervillea sonora*, *Jatropha cuneata*, y *Selaginella lepidophylla*, especies vegetales diferentes a las que utilizamos en este estudio, reportaron que *S. aureus* fue la bacteria más susceptible a todas las plantas estudiadas, aunque las especies vegetales fueron diferentes, estos resultados son similares a los de este estudio.

Con referencia a las observaciones de la concentración mínima inhibitoria (MIC), solamente se le determinó a los extractos que presentaron actividad antimicrobiana. Se reportó la MIC de los extractos activos; *L. frutescens*, *T. stans*, *F. splendens*, *E. antisiphylitica*, *T. lucida*, *P. dactylifera*, *F. cernua* y *A. americana* contra *S. aureus* (AC), *E. coli* 0157 y *Enterobacter aerogenes* 9183, se demostró una MIC menor o igual a 30 µg/mL, aunque en la literatura no se citó un trabajo similar, un reporte del extracto metanólico de *Calophyllum brasiliense* contra *S. aureus* reporta una MIC de 32 µg/mL (Kakuko *et al.*, 2005). En cambio, se reportaron resultados diferentes al presente estudio con la especie *Piper regnelli* contra *S. aureus* en donde Barbieri-Holetz F *et al.* (2002) reportaron una MIC de 7.7 µg/mL. En otro reporte con las especies de *Schinus molle* y *Cyperus alternifolius* resultaron activas sobre *S. aureus* con una MIC de 62.5 y 250 µg/mL respectivamente (Salazar-Aranda *et al.*, 2011). Kuete *et al.* (2011) evaluaron el extracto metanólico de *Artocarpus communis* (Moraceae), ellos reportaron que el extracto fue activo contra *S. aureus* y *E. coli* ATCC8739 con una MIC de 64 µg/mL.

Las plantas con actividad antimicrobiana se sometieron al estudio fitoquímico bidirigido para identificar parcialmente los compuestos responsables de dicha actividad. Las ocho plantas que mostraron actividad se particionaron con cloruro de metileno para el estudio de bioautografía. Resultando solo la especie de *L. frutescens* activa contra *S. aureus* (AC), en la que se observaron tres bandas que corresponden a compuestos flavonoides y quinonas, con las cuales se comprobó nuevamente la actividad antibacteriana, Mehrotra *et al.* (2010) con las especies Amla y Neem encontraron al menos dos componentes activos de flavonoides y taninos contra *S. aureus*, lo cual es comparable con las tres bandas de este estudio. Bastos *et al.* (2009) realizaron un estudio con el extracto clorofórmico-metanólico de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur, en el que demostraron la presencia de cuatro flavonas las cuales se evaluaron por bioautografía contra *S. aureus*. Encontraron que dos compuestos fueron activos para *S. aureus*, resultados que coinciden con la actividad demostrada en éste estudio, pero con una especie vegetal diferente a *L. frutescens*.

Debido a que el objetivo del trabajo fue evaluar la actividad biológica de los extractos de las plantas, incluida la toxicidad, se determinó la DL_{50} con el ensayo de letalidad sobre *Artemia salina*, ensayo considerado de tamizaje para sistemas biológicos (Lagarto-Parra *et al.*, 2001; Bastos *et al.*, 2009) asegurando con ello su efectividad y nula toxicidad. En este trabajo se encontró una $DL_{50} > 1,000 \mu\text{g/mL}$ para el extracto metanólico de las plantas en estudio, excepto *L. frutescens* que mostró una DL_{50} de $290.88 \mu\text{g/mL}$, este resultado indica que el extracto tiende a ser tóxico, según la escala de Déciga *et al.* (2010). En un estudio realizado por Morales (2006), obtuvo una DL_{50} de $64.57 \mu\text{g/mL}$ del extracto metanólico de *Lophocereus schottii* sobre la letalidad de crustáceo *A. salina*. Carballo (2002) y sus colaboradores demostraron la correlación establecida previamente entre el ensayo de letalidad y la citotoxicidad, en su reporte recomendaron que se realicen ambos ensayos simultáneamente lo cual se realizó en este estudio, en concordancia con estudios previos, el extracto de *L. frutescens* se sometió a pruebas de citotoxicidad con la línea celular VERO (células de riñón de mono verde africano). Se han utilizado las líneas celulares en la búsqueda de extractos vegetales para determinar citotoxicidad y asociarla con la actividad antitumoral (Sagar *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la actividad citotóxica de las hojas de *L. frutescens* en la línea celular VERO fue de IC_{50} de $58.0 \mu\text{g/mL}$. Considerando que un extracto crudo que presenta una IC_{50} con un valor superior de $30 \mu\text{g/mL}$ se postula que este extracto debería ser sometido a fraccionamiento biodirigido hasta aislar los compuestos por su probable actividad antitumoral (Kalaivani *et al.*, 2011; Chetan *et al.*, 2010). Un estudio con el extracto metanólico de raíz de *H. amplexicaule* en la línea celular VERO reportó una IC_{50} de $250 \mu\text{g/mL}$ (Leos *et al.*, 2010), en este sentido un estudio realizado por Sevimli-Gur (2010) evaluaron naftaquinonas de *Alkanna cappadocica* (Boraginaceae) en doce líneas celulares de cáncer humano y la línea celular normal VERO, reportaron citotoxicidad con valores entre 0.09 and $14.07 \mu\text{g/mL}$.

Considerando la citotoxicidad producida por un extracto o un compuesto activo sobre una línea celular normal, se puede determinar su selectividad comparándolo con pruebas biológicas.

Las bandas cromatográficas con actividad antibacteriana con la bioautografía fueron sometidas a análisis con cromatografía de gases masas para identificar parcialmente los compuestos responsables de la actividad. Fueron identificados cinco compuestos,

destacando el ácido homovanílico metil ester como componente mayoritario con el tiempo de retención de 27.8. En cuanto al número de compuestos, en un reporte se identificaron siete compuestos con el extracto metanólico de hojas de *Acanthus ilcifolius* (Ganesh y Vanila, 2011). Según Harborne *et al.*, 2001, el 40% de las plantas producen alcaloides y en este trabajo de investigación no se identificaron.

9.- CONCLUSIONES

- ✓ Los extractos metanólicos de las plantas en estudio: *Leucophyllum frutescens*, *Fouquieria splendens*, *Tecoma stans*, *Euphorbia antisyphilitica*, *Tagetes lucida*, *Phoenix dactylifera*, *Agave americana* y *Flourencia cernua* fueron activos al menos con alguna de las cepas bacterianas evaluadas de referencia ATCC: *Klebsiella pneumoniae* No 9183, *Staphylococcus aureus* No BAA44, *Escherichia coli* O157, *Enterobacter aerogenes* 9180, *Enterobacter cloacae* 9235 y de aislados clínicos (AC): *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina lutea*.
- ✓ Los extractos metanólicos de *L. frutescens*, *T. stans*, *F. splendens*, *E. antisyphilitica* y *T. lucida* mostraron actividad antibacteriana a 250 µg/mL contra *S. aureus* de aislado clínico, con un halo de inhibición de 10-12 mm.
- ✓ Los extractos metanólicos de *L. frutescens*, *F. splendens*, *P. dactylifera* *F. cernua* contra *E. antisyphilitica* y *T. lucida* mostraron actividad antibacteriana a 250 µg/mL contra *E. coli* ATCC O157 con un halo de inhibición de 10-12 mm
- ✓ Los extractos metanólicos de *F. cernua* y *E. antisyphilitica* mostraron actividad antibacteriana a 250 µg/mL contra *E. aerogenes* ATCC 9183 con un halo de inhibición de 10 mm
- ✓ La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos metanolicos sobre *S. aureus* (AC) fueron de: 25.4, 36.1, 36.1, 25.0, 26.8 y 23.0 µg/mL para *L. frutescens*, *T. stans*, *F. splendens*, *E. antishypilitica* y *T. lucida* respectivamente.
- ✓ La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos metanólicos sobre *E. cloacae* ATCC 9235 fueron de: 32.6, 29.2 y 33.0 µg/mL para *T. lucida*, *F. cernua* y *A. americana* respectivamente.

- ✓ La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos metanólicos sobre *E. coli* ATCC 0157 fueron de: 30.0, 27.1 y 34.0 µg/mL para *L. frutescens*, *F. splendens* y *P. dactylifera* respectivamente.
- ✓ La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto metanólico sobre *E. aerogenes* ATCC 9183 fue de: 30.1µg/mL para *E. antishypilitica*
- ✓ Los extractos que tuvieron mayor actividad fueron los de *T. lucida* con una CMI de 23.0 µg/mL y *F. splendens* 25.0 µg/mL sobre *S. aureus*.
- ✓ Las fracciones clorofórmicas del extracto metanólico de *L. frutescens* con Rf 0.4, 0.5 y 0.6 presentaron actividad sobre *S. aureus* por bioautografía.
- ✓ Los extractos evaluados de las 10 plantas en estudio sobre nauplios de *Artemia salina* no mostraron toxicidad a excepción de *L. frutescens* con una LD₅₀ de 290.88 µg/mL y un Índice de Toxicidad Media (CI₅₀) de 58.56 µg/mL sobre la línea celular VERO.

De los resultados obtenidos en este estudio 8 de las plantas evaluadas de la flora del Norte de México muestran una buena correlación entre los datos experimentales y el uso de las plantas en medicina tradicional mexicana para el tratamiento de algunos trastornos infecciosos del tracto gastrointestinal y respiratorio; además contribuyen al conocimiento farmacológico de la flora medicinal del semidesierto del Norte de México y con los resultados obtenidos de *L. frutescens* podrían ser la base de estudios posteriores para evaluar la citotoxicidad sobre células cancerosas y aislar los compuestos activos de esta planta.

10.- BIBLIOGRAFIA

1. Alanís BA, Salazar R, Ramírez R, Garza E, Waksman N. 2012. A new antimycobacterial furanolignan from *Leucophyllum frutescens*. Nat Prod Commun. 7(5):597-598.
2. Alireza A, Rastega PN, De los Ríos P. 2010. The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchipoda) I True and false taxonomical descriptions. Lat. Am. J. Aquat. Res. 38(3): 501-506
3. Alzoreky NS, Nakahara K. 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. Journal Food Microbial. 80(3): 223-230.
4. Anoopkumar S, Carey JB, Conere T, O'Sullivan E, Van Pelt FN, Allshire A. 2005. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. Br J. Radiol. 78 (934): 945-947
5. Araujo J, Córdova B, Rodríguez M, Salas R. 2004. Cuantificación de la actividad antimicrobiana de *Caesalpinia spinosa* contra *Staphylococcus aureus*. Resúmenes del III Congreso Peruano de Plantas Medicinales y Fitoterapia.
6. Arencibia DF, Rosario LA, Curveco DL. 2003 Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Revista de Toxicología. 40-52.
7. Balandrin M, Kinghorn AD (eds). 1993. Plant-derived natural products in drug discovery and development. ACS Symposium Series, American Chemical Society Washington, 3-10.
8. Barbieri F, Pessini GL, Sanches R, García DA, Vataru C, Prado B. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine of the treatment of infectious diseases. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 97(7): 1027-1031.
9. Barquero AA. 2007. Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. Revista Química Viva. 2 (1): 35
10. Bastos MLA, Lima MRF, Conserva LM, Andrade VS, Rocha EMM, Lemos RPL. 2009. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. Annals of Clinical Microbiology and. Antimicrobials. 8(16): 1-6
11. Bermúdez A, Oliveira MA. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Red de Revistas

- Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Interciencia. Asociación Interciencia. 453-459.
12. Bernas T, Dobrucki J. 2002. Mitochondrial a Nonmitochondrial Reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1 and NAO Mitochondrial Fluorescent Probes. *Cytometry*. 47 (4): 236-242.
 13. Bhimba VB, Meenupriya J, Elsa J, Edaya D, Kumar S, Thangaraj M. 2010. Antimicrobial activity and characterization of secondary metabolites isolated from mangrove plant *Avicenia officinalis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 4:12-420.
 14. Bilia A, Riva A. 2000. Herbal Medicinal Products. *Fitoterapia* 71: 343-345.
 15. Booth NL, Kruger CL, Wallace A, Clemens R. 2012. An innovative approach to the safety evaluation of natural products: Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) leaf aqueous extract as a case study. *Food Chemical Toxicology*. 9: 3150-3165.
 16. Cabrera CE, Gómez RF. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*. 38(2): 149-158.
 17. Carballo JL, Hernández ZL, Pérez P, García MD. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol*. 23;2:17.
 18. Céspedes C, Avila J, Martínez A, Serrato B, Calderón J, Salgado R. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *J Agric Food Chem*. 54(10): 3521-3527
 19. Chesman L, Jerald JN, Van Staden J. 2012. Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophone disticha*. *Journal of Ethnopharmacology*. 140 (2): 405-408.
 20. Chetan A, Rajesh P, Sanjay D, Jitesh J. 2010. In vitro cytotoxicity study of Agave americana, Strychnos nuxvomica and Areca catechu extracts using MCF-7 Cell line. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology Research*. 1(12): 245-252
 21. Chlibek R, Hartmanova M. 2006. The Use of Foam Substances for Disinfection." *Indoor and Built Environment*. 15(1): 77-79
 22. Clinical and Laboratory Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2006. Seventeenth Informational Supplement M100-S17. Wayne, USA.

23. Cowan ST, Steel KJ. 1993. Manual for the Identification of Medical Bacteria. London, England, Cambridge University Press. 47-51.
24. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. 1997. Natural Products in Drug Discovery and Development. Journal of Natural Products. 60(1): 52-60.
25. Dakie I, Morrison D, Vukovic D, Savic B, Shittu A, Jezek P, Hauschild T, Stepanovic S. 2005. Isolation and molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* in the hospital enviromental. Journal of Clinical Microbiology. 43: 2782-2785.
26. Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK. 2012. Efficacy of plant extracts in plant disease management Journal of Medicinal Plants Research. 4(2): 104-111
27. De León L, López MR, Maujir L. 2010. Antibacterial properties of Zeylasterone, a triterpenoide isolated from *Maytenus blepharodes*, against *Staphylococcus aureus*. Microbial Research. 165:617-626.
28. Déciga M, Rivero I, Arriaga M, Castañeda G, Angeles G, Navarrete A, Mata R. 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology. 110 (2): 334-342.
29. Desire O, Riviere C, Razafindrazaka R, Goossens L, Moreau S, Guillon J, Uverg-Ratsimamanga S, Andriamadio P, Moore N, Randriantsoa A, Raharisololalao A. 2010. Antispasmodic and antioxidant activities of fractions and bioactive constituent davidigenin isolated from *Mascarenhasia arborescens*." Journal of Ethnopharmacol. 130(2): 320-8.
30. Domingo D, López-Brea M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Revista Especializada Quimioterapia. 385-393.
31. Doughari JH. 2006. Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. Trop. Pharmaceutical Research. 5(2): 597.
32. Drummond AJ, Waigh RD. 2000. The development of microbiological methods for phytochemical screening. Recent research developments. Phytochemistry 4: 143-152.
33. Edwin E, Sheeja E, Toppo E, Tiwari V, Dutt KR. 2007. Efecto antimicrobiano, antiulceroso y antidiarreico de las hojas de buganvilla (*Bougainvillea glabra* Choisy). Ars. Pharmaceutica. 48(2): 135-144
34. Elvin-Lewis M. 2001. Should we be concerned about herbal remedies. Journal of Ethnopharmacology. 75: 141-164.

35. Engelbertz J, Lechtenberg M, Studt L, Hensel A, Versopfl EJ. 2012. Bioassay-guided fractionation of a thymol-deprived hydrophilic thyme extract and its antispasmodic effect. *Journal of Ethnopharmacology*. 141(3): 848-53.
36. Escobar L, Rivera A, Aristizábal FA. 2010. Estudio comparativo de los métodos de rezasurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Journal Vitae*. 17(1): 67-74.
37. Estrada E, Villarreal JA, Jurado E. 2005. Leguminosas del Norte del Estado de Nuevo León, México. *Acta Botánica Mexicana*. 7(3):1-18.
38. Etkin NL. 1998. Indigenous patterns of conserving biodiversity: pharmacologic implications. *Journal of Ethnopharmacology*. 63(3): 233-245.
39. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. 2007. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th Edition. Elsevier Mosby. St. Louis USA.
40. Fortuna AM, Juárez ZN, Bach H, Nematallah A, Av-Gay Y, Sánchez E, Catalán CA, Turbay S, Hernández LR. 2011. Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones and inositol derivatives from *Hymenoxys robusta*. *Journal of Phytochemistry*. 72 : 2413-2418
41. Frolich C, Hartmann T, Ober D. 2006. Tissue distribution and biosynthesis of 1,2-saturated pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis hybrids* (Orchidaceae). *Journal of Phytochemistry*. 67(14): 1493-502.
42. Galvez J, Sanchez F, Jimenez J, Zarzuelo A. 2001. Effects of flavonoids on gastrointestinal disorders. Elsevier, Sci. 25: 607-649.
43. Ganesh S, Vanila J. 2011. Phytochemical analysis of *Acanthus ilcifolius* y *Avicennia officinalis* by GC-MC. *Research Journal of Phytochemistry*. 5: 60-65
44. García L, Verde J, Castro R, Chávez A, Oranday A, Núñez A, Rivas C .2010. Actividad biológica de un extracto de orujo de uva mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 4(41): 28-36.
45. Gilbert P, McBain AJ. 2003. Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(2): 189-208.
46. González M, Eilmus S, Muck A, Svatos A, Heil M. 2006. Pathogenesis-related proteins protect extrafloral nectar from microbial infestation. *The Plant Journal*. 58(3):464-73.
47. González A, Alcántar D, Cuauhtli M, Daza C, Gayosso C, Solache G, Horta C, Mejia F, Santos JI, Alpuche C. 2001. Multiresistant extended-spectrum β -

- lactamaseproducing *Klebsiella pneumoniae* causing an outbreak of nosocomial bloodstream infection. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 22 (11): 723-725.
48. Green RJ. 2004. Antioxidant Activity of Peanut Plant Tissues. Master Thesis. North Carolina State University. 2004. USA.
 49. Gutiérrez M.C, Droguet M. Identificación de compuestos volátiles por cg-ms. <http://www.buenastareas.com/ensayos/Cromatografia-De-Gases/4487126.html>. consultado 11 Mayo 2013.
 50. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. 2004. Comparison of Alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology In Vitro*. 8(5):703-710
 51. Harborne JB, Baxter H, Moss GP 2001.. *Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, 2nd Edition, Taylor and Francis, Philadelphia USA.
 52. Harvey A. 1999. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *Trends Pharmacology Science* 20: 196-198.
 53. Hernández JT, García E, Giono S, Aparicio G. 2003. *Bacteriología Médica Diagnóstica*. Ediciones Cuéllar. México D.F
 54. Hernández T, Canales M, Flores C, García AM, Duran A, Avila JG. 2006. Antimicrobial Activity of *Tagetes lucida*. *Pharmaceutical Biology*. 44 (1): 19-22.
 55. Huang KCH. 1999. *The Pharmacology of Chinese herbs*. CRC Press. Boca Ratón Florida U.S.
 56. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. 2005. *Microbiología médica*. 18a ed.: Editorial El Manual Moderno. México D.F.
 57. Kalaivani T, Rajasekaran C, Suthindhiran K, Lazar M. 2011. Free Radical Scavenging, Cytotoxic and Hemolytic Activities from Leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex. Delile subsp. *indica* (Benth.) Brenan. *Evidence-Based Complementary an Alternative Medicine*. pp3-11
 58. Kakuko Y, Fumiko A, Ariaki N, Hikaru O, Lozada L, López E, Estrada E, Aguilar A, Reyes R. 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *Journal of Ethnopharmacology*. 97(2): 293–299
 59. Karou D, Dicko MH, Sanon S, Simpore J, Traore AS. 2005. Antioxidant and

- antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*. 4(8): 823-828.
60. Khan MTJ, Ahmad K, Alvi MN, Amin N, Mansoor B, Asif M, Khan FZ, Jamshaid M. 2010. Antibacterial and Irritant Activities of Organic Solvent Extracts of *Agave americana* Linn., *Albizzia lebbek* Benth. *Achyranthes aspera* Linn. and *Abutilon indicum* Linn - A Preliminary Investigation. *Pakistan Journal of Zoolgy*. 42(1):93-97.
 61. Khan AU, Gilani AH. 2009. Antispasmodic and bronchodilator activities of *Artemisia vulgaris* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and calcium influx. *Journal of Ethnopharmacol* 126(3): 480-486.
 62. Kahkashan P, Najat AB, Soliman DAW. 2012. Antibacterial activity of *Phoenix* pathogenic bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(2): 296-300.
 63. Kuete V, Hippolyte K, Wabo K, Eyong O, Michel T, Feussi BW, Krusche B, Tane P, Folefoc GN, Efferth T. 2011. Anticancer Activities of Six Selected Natural Compounds of Some Cameroonian Medicinal Plants. 6(8):21762.
 64. Kuklinski C. 2000. *Farmacognosia*. España, Ediciones Omega.
 65. Kumar S, Shukla Y. 2003. Herbal medicine: Current Status and the Future. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 4: 281-288.
 66. Kummerer K. 2000. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 454(2): 311-320.
 67. Lagarto-Parra A, Silva-Yhebra R, Guerra-Sardiñas I, Iglesias-Buela L. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8(5):395-400.
 68. Leos C. 2010. Estudio de la actividad biológica de los extractos de tres plantas de la familia Boraginaceae. Tesis Diocctoral Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo Lerón.
 69. Levy S. 2002. Factors impacting on the photoquím of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**: 25-30.
 70. Lieberman MM, Patterson GM, Moore RE. 2001. In vitro bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other assays parameters on growth inhibitory activity. *Cancer Letters*. 173(1): 21-29.

71. López PY, Angulo EM. 2007. Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22. *Bioquímica* **32**(4):117-125.
72. Lugo G. 2005. *Bacteriología Médica*. Tercera ed. Ediciones Cuellar.
73. Ramírez LS, Marin D. 2009. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 42: 263-268.
74. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2009. *Biología de los microorganismos*. 10 edición. Madrid Pearson Educación.
75. Mata R, Bye R, Linares E, Maci M, Rivero-Cruz I, Pérez O, Timmerman BN. 2003. Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry* 64(1): 285-291.
76. Mbata TI, Debiao L, Saikia A. 2006. Antibacterial activity of the crude extract of Chinese Green Tea. *African Journal of Biotechnology* 7(19): 1571.
77. McLaughlin J, Lingling L, Rogers M. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information*. 32: 513-524.
78. Mehrotra S, Srivastava AK, Nandi SP. 2010. Comparative antimicrobial activities of Neem, Amla, Aloe, Assam Tea and Clove extracts against *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(22): 2393-2398.
79. Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nichols D, McLaughlin J. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45 (1): 31-34.
80. Mishra BB, Tiwari VK. 2011. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46(10): 4769-807.
81. Molina-Salinas GM, Said-Fernández S. 2006. Modified microplate cytotoxicity assay whit brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacologyonline* 3: 633-638.
82. Molina-Salinas GM, Ramos-Guerra MC, Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, Becerril-Montes P, Said-Fernández S. 2006. Bactericidal Activity of Organic Extracts from *Flourensia cernua* DC. *Archives Medical Research* 37 (1): 45-49.
83. Molina-Salinas G.M, Pérez-López A, Becerril-Montes P, Salazar-Aranda R,- Said-Fernández S, Waksman de Torres N. 2007. Evaluation of the flora of

- Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology* 109 (3): 435–441.
84. Morales RME. 2006. Extractos de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton and Rose y *Stenocereus gummosus* (Engelmann) Gibson y Horak con actividad antibacteriana y antineoplásica sobre líneas celulares humanas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
 85. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2): 55-63.
 86. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2001. Disk diffusion supplemental tables M100-S10 (M2). Wayne, Pennsylvania.
 87. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (NCCLS). 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. XII Informational Supplement. M100-S12. Wayne, Pennsylvania.
 88. Navarro V, Rojas G, Zepeda G, Aviles M, Fuentes M, Herrera A, Jiménez E. 2006. Antifungal and Antibacterial Activity of Four Selected Mexican Medicinal Plants. *Pharmaceutical Biology*. 44 (4) :297-300.
 89. Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology* 7(12): 1797.
 90. Nguta JM, Mbaria JM, Gakuya DW, Gathumbi PK, Kabasa JD, Kiama SG. 2012. Evaluation of Acute Toxicity of Crude Plant Extracts from Kenyan Biodiversity using Brine Shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). *The Open Conference Proceedings Journal* 3(30-34) 2210-2892.
 91. Nostro A, Germanó MP, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli, MA. 2000. Extraction Methods and Bioautography for Evaluation of Medicinal Plant Antimicrobial Activity. *Letters in Applied Microbiology*. 30: 379-384.
 92. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*. 267 (17): 5421-5426.
 93. Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Haahtela K, Vuorela P. 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology* 73: 299-305.

94. Ojo OO, Ajayi AO, Anibijuwon II. 2007. Antibacterial Potency of methanol extracts of lower plants. *Journal of Zhejiang University Science* 8 (3):189-195.
95. OMS. 2004. Quality control methods for medicinal plants. Geneva, World, Health Organization.
96. Stata. 2012. Stata Corporation, Computing Resource Center, College Station, Texas. <http://www.stata.com>. Consultado 30 de Agosto 2012.
97. Parekh J, Karathia N, Chanda S. 2006. Screening of some traditionally used medicinal plants for potential antibacterial activity. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 68(6): 832-834.
98. Perveen K, Bokhari NA, Soliman DAW. 2012. Antibacterial activity of *Phoenix dactylifera* L. leaf and pit extracts against selected Gram negative and Gram positive pathogenic bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(2): 296-300.
99. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 2004. Microbiología. 4ª Ed. McGraw-Hill Interamericana.
100. Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ. 2002. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology In Vitro* 16 (5): 599-607.
101. Rangel D. 2001. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* Revista de la Facultad de Farmacia de los Andes, Venezuela 42: 43-46.
102. Rivas C, Salinas C, Galán L, Medrano R. 2007. Operación unitaria para la propagación de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 para la producción de proteasas con potencial biotecnológico. Patente IMPI MX/10892.
103. Rojas JJ, Ochoa VJ, Ocampo SA, Monoz JF. 2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 6: 2.
104. Rodríguez R, Morales ME, Verde MJ, Oranday A, Rivas C, Núñez MA, González GM, Treviño J. 2010. Actividad antibacteriana y antifúngica de las especies de *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) y *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) (Cactaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 57-58.
105. Rolón M, Vega C, Escario JA, Gómez A. 2006. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*. 99 (2): 103-107.

106. Ruiz E, Velázquez C, Garibay A, García Z, Plascencia J, Cortez M, Hernández J, Robles R. 2009. Antibacterial and antifungal Activities of Some Mexican Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Food*. 12 (6)1398-1402
107. Sagar SM, Yance D, Wong RK. 2006. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigation a new agents to treat cancer- Part 1 and 2. *Journal Current Oncology* 13 (1), 14-26.
108. Salazar-Aranda R, Pérez-López LA, López-Arroyo J, Alanís-Garza BA, Waksman de Torres N. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from Northeast México. *Evid Based Complement Alternative Medicines*. 2011: 536139.
109. Sasidharan S, Chen Y, Sundram D, Sundrama KM, Yoga L. 2011. Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts. *African Journal Traditional Complementary Alternative Medicines*. 8(1): 1–10.
110. Saxena S, Gomber C. 2006. Antimicrobial potential of *Callistemon rigidus*. *Journal Pharmaceutical Biology* 44(3): 194-201.
111. Schmourlo G, Mendonca-Filho RR, Alviano CS, Costa SS. 2004. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal food plants. *Journal of Ethnopharmacology* 96(3): 563.
112. Sevimli-Gur C, Akgun IH, Deliloglu-Gurhan I, Korkmaz KS, Bedir E. 2010. Cytotoxic naphthoquinones from *Alkanna cappadocica* (perpendicular). *Journal of Natural Products* 73(5):860-4.
113. Shing M, Ali S, Akhtar M, Suraj K. 2012. Efficacy of plant extract in plant disease management. *Agricultural Sciences* 3(3):433-455.
114. Smith DL, Levin SA, Laxminarayan R. 2005. Strategic interactions in multi-institutional epidemics of antibiotic resistance. *Proceeding of the National Acadademy of Sciences of the United Sates of the America* 102(8): 3153-8.
115. Smith JE, Tucker D, Watson K, Jones GL. 2007. Identification of antibacterial constituents from the indigenenous Australian medicinal plant *Eremophila duttoni* F. Muell. (Myoporaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 112:386-393.
116. Umeh EU, Oluma H, Igoli J. 2005. Antibacterial Screening of Four Local Plants Using An Indicator-Based Microdilution Technique. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines* 2 (3): 238–243.

117. UNAM. 2009. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Consultada en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>, 30 de Agosto de 2012.
118. Valgas C, Machado de Souza S, Samania EFA, Samania A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:369-380.
119. Varaprasad B, Prasanth K, Katikala K, Chandrasekhar N, Somasekhar P. 2009. Antifungal activity of selected plant extracts against phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* F2723. *Indian Journal of Science and Technology* 2 (4).
120. Verastegui MA, Verde MJ, Garcia AJ. 1998. Bioautografía para detectar la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas. *Revista de la Sociedad Química de México XXXIII Congreso Mexicano de Química. XVII Congreso de Educación Química* pp. Noviembre. 131.
121. Vernon M, Trick W, Welbel S, Peterson B, Weinstein R. 2003. Adherence with hand hygiene: Does number of sinks matter? *Infection Control and Hospital Epidemiology* 24 (3): 224-225.
122. Vidal J, Carbajal A, Sisniegas M, Bobadilla M. 2009. Toxic activity of *Argemone subfusiformis* Ownb. and *Tagetes patula* Link against *Aedes aegypti* L. Fourth instar larvae and pupae. *Revista Peruana de Biología*. 15(2): 103-109.
123. Waizel J, Salomon H. Algunas plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de enfermedades respiratorias. *Medigrafic Artemia*. 2005; 50 (4)
124. Williamson EM, Okpako DT. 1996. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. England, Wiley and Sons.
125. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC, Woods GL. 2008. *Koneman Diagnóstico Microbiológico* Edición: 6ª Médica Panamericana.

ANEXOS



Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
Nicolás San Juan No. 1511 Colonia del Valle
Delegación Benito Juárez C.P. 03100
México, D.F.
Tel: 9183-2060 Fax: 9183-2071
www.afmac.org.mx

Expediente: 433

México, D.F. a 12 de mayo de 2013

M. C. María del Carmen Vega Menchaca
Facultad de Ciencias Biológicas
UANL

Presente

Estimada maestra Vega:

Tengo el agrado de comunicarle que el artículo perteneciente a la sección **Trabajo Científico** intitulado:

"Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) I.M. Johnst del Norte contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos"

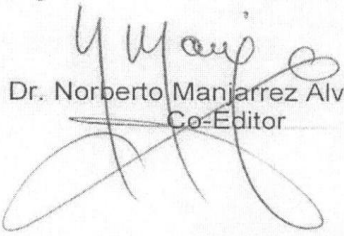
de los autores *María del Carmen Vega Menchaca, Julia Verde Star, Azucena Oranday Cárdenas, María Eufemia Morales Rubio, María Adriana Núñez González, Mario Alberto Rivera Guillén, Luis Benjamín Serrano Gallardo, Catalina Rivas Morales*, ha sido aceptado para su publicación en la *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* en el Vol. 44, No. 2 abril-junio 2013.

La Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas está indizada a: Internacional Pharmaceutical Abstracts, Chemical Abstracts, EMBASE de Excerpta Medica, Latindex, Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnología del CONACyT (expediente No. 66688) y a la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (Redalyc).

Esperando contar nuevamente con material de su autoría, quedo de usted.

Atentamente

Por la superación Técnica y Científica


Dr. Norberto Manjarrez Alvarez
Co-Editor


Dra. Dea Herrera Ruiz
Editora

c.c.p. Dra. Dea Herrera Ruiz Editora RMCF
c.c.p. Archivo AFMAC

F-ER-AFM-018

African Journal of Microbiology Research

Dear

We are yet to receive the response to the reviewer's evaluations sent to you by our Editorial office. Kindly indicate the effected changes (correction) as indicated in the Reviewers' Evaluation. Please write out your responses for each of the points raised by the reviewer or the step by step actions taken to effect the corrections in a separate MS Word file. You may also highlight where you effected the corrections on your revised manuscript with a different colour, and send the corrected version to us as soon as possible. Please note that subsequent evaluations may be sent to you if the need arises and that the reviewers comment is a guide to improve your manuscript before the editor's decision. We look forward to receiving your revised manuscript as soon as possible. We encourage you to reduce the numbers of self citations of previous studies within the manuscript. Also edit the reference section of your article using the correct format. Please track your manuscripts on www.ms.academicjournals.org

Date	29-Apr-2013
Manuscript Number	AJMR-12-1759 Menchaca et al
Manuscript Title	Antimicrobial activity of five plants from northern Mexico on medically important bacteria of clinical isolates and ATCC
Current Status	First Revision Reminder



[View Archive](#)

Contacts Us

Editorial Office: ajmr@academicjournals.org

Accounts Unit:
accounts@academicjournals.org

Help Desk: helpdesk@academicjournals.org

Submit manuscripts:
ms.academicjournals.org/

Website: www.academicjournals.org/

**Thank you for submitting your manuscript
to the African Journal of Microbiology
Research**

academicJournals

Latinoamericana de Química

Revista



ISSN 0370-5943

SUPLEMENTO ESPECIAL - 2012

FAO-04 PLANTAS MEDICINALES DEL NORTE DE MEXICO CON ACTIVIDAD BACTERICIDA

María del Carmen Vega Menchaca^{1,3}, Catalina Rivas Morales¹, Azucena Oranday Cárdenas¹, María Eufemia Rubio Morales¹, María Adriana Núñez González¹, Luis Benjamín Serrano Gallardo.²

¹Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León. ²Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila, Gregorio A. García 198, Sur, Torreón Coahuila. ³Laboratorio de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, Artículo 123 S/N Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio Durango. Correo electrónico: cermelivega2006@yahoo.com.mx

Los productos naturales contienen una amplia diversidad de compuestos químicos que poseen el potencial para obtener precursores antimicrobianos que puedan utilizarse en el combate de bacterias patógenas aisladas de muestras clínicas resistentes a los antimicrobianos actuales. En años recientes se ha incrementado el interés por el uso de las plantas medicinales para el control de microorganismos patógenos para el hombre, de ahí la importancia de valorar la eficacia de su uso potencial como nuevos antimicrobianos, además de contribuir a la validez científica de su uso etnomedicinal. En este trabajo se valoró la actividad antimicrobiana de cinco especies vegetales nativas colectadas en el Norte de México. Los ensayos se realizaron con extractos metanólicos de las partes aéreas de cada especie vegetal los cuales se evaluaron a tres concentraciones (1000, 500 y 250 µg/mL) con las cepas de referencia *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9183), *Staphylococcus aureus* (ATCC BAA44), *Escherichia coli* (O157), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 9180) y *Enterobacter cloacae* (ATCC 9235) y ocho cepas de aislados clínicos (AC) *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina lutea* y *Streptococcus pyogenes* por el método de difusión en disco en agar. Los extractos que mostraron actividad relevante se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en placa de 96 pozos y se evaluó la toxicidad (DL₅₀) con el bioensayo de *Artemia salina* en microplaca. Los extractos de *Leucophyllum frutescens*, *Tecoma stans*, *Fouquieria splendens*, *Euphorbia antisyphilitica* y *Tagetes lucida* mostraron excelente actividad antibacteriana a las tres concentraciones contra la cepa clínica de *Staphylococcus aureus* con una CMI de 25.4, 36.1, 25.0, 26.8 y 23.0 µg/mL respectivamente. Los extractos de *Leucophyllum frutescens*, *Tecoma stans*, inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* O157 a las concentraciones de prueba con una CMI 30.0 y 27.1 µg/mL respectivamente. *Euphorbia antisyphilitica* y *Leucophyllum frutescens* a las tres concentraciones mostraron actividad antibacteriana contra la cepa de referencia *Enterobacter aerogenes* 9183 con una MIC 30.1 y 25.4 µg/mL respectivamente. *Tagetes lucida* mostró actividad antibacteriana contra la cepa de referencia *Enterobacter cloacae* 9235 a las tres concentraciones y una MIC de 32.6 µg/mL. La actividad antibacteriana mostrada fue lineal en función de la concentración de los extractos. Las bacterias que no mostraron actividad con los extractos evaluados fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *Escherichia coli* cepas de aislados clínicos, y con las cepas de referencia *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9183) y *Staphylococcus aureus* (ATCC BAA44). Con el bioensayo de *Artemia salina* los extractos de *L. frutescens* y *T. lucida* resultaron tóxicos con una LD₅₀ = 196.7 y 33.13 µg/mL respectivamente. Los resultados de este estudio muestran una buena correlación entre los usos de las plantas en medicina tradicional mexicana y los datos experimentales, mostrando que los extractos fueron activos al menos con alguno de los microorganismos probados. Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento farmacológico de la flora medicinal del semidesierto del Norte de México que podría ser la base de estudios posteriores para aislar los compuestos activos de las plantas estudiadas y probar su efectividad antimicrobiana, y evaluarlos contra otros microorganismos patógenos.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, toxicidad, extracto metanólico, inhibición bacteriana.

FAP-04 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CUATRO ESPECIES VEGETALES DEL NORTE DE MEXICO

Luis Benjamín Serrano Gallardo¹, Irais Catillo Maldonado^{1,2}, Claudia Guadalupe Borjón Ríos², María del Carmen Vega Menchaca²

¹Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila. ²Laboratorio de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango. : serranoluis@yahoo.com

En años recientes se ha incrementado el interés por las plantas medicinales como alternativa para inactivar microorganismos patógenos. En la literatura científica hay suficiente evidencia de que algunas especies vegetales son capaces de controlar desórdenes infecciosos de etiología microbiana. Los problemas de resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos sintéticos y los efectos secundarios que poseen los antibióticos, ha generado un particular interés por conocer la actividad antibacteriana de las plantas y el potencial descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades infecciosas. En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de las especies vegetales del Norte de México utilizadas en Medicina Tradicional: *Carya illinoensis* (Koch), *Selaginella lepidophylla* (Hook y Grev), *Euphorbia antisiphilitica* (Zucc) y *Jatropha dioica* (Moe Ti Sesse) contra las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* BAA44 y *Klebsiella pneumoniae* 9183, y las cepas de aislados clínicos (ac) *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* por el método del replicador de Steers. Se obtuvieron los extractos metanólicos de raíz y tallo de las especies vegetales y se evaluaron a tres concentraciones: 500, 1000 y 2000 µg/ml contra las cepas de estudio. Los resultados indican que los extractos mostraron actividad contra las bacterias probadas. *Carya illinoensis* mostró mayor inhibición a la concentración de 1000 µg/ml contra *E. coli* (ac) y la concentración mínima inhibitoria (CMI) del resto de las bacterias en estudio fue de 500 µg/ml. Para *Selaginella lepidophylla* se observó que *K. pneumoniae* (ac) mostró una inhibición a concentración-respuesta y su CMI fue de 500 µg/ml. El tallo de *Euphorbia antisiphilitica* produjo inhibición a concentración-respuesta contra *S. aureus* BAA44 y una CMI de 500 µg/ml. El extracto metanólico de tallo de *Jatropha dioica* mostró actividad a concentración-respuesta contra *K. pneumoniae* (ac) y CMI de 500 µg/ml. Todos los extractos metanólicos de las especies vegetales en estudio presentaron una concentración mínima inhibitoria de 500 µg/ml. Nuestros resultados sugieren que el extracto de las plantas muestran inhibición de crecimiento de las bacterias Gram (-) y cocos Gram (+). En este trabajo se demostró la actividad antimicrobiana de cuatro especies de la región semidesértica al Norte de México, lo que contribuye con el incremento del conocimiento del acervo vegetal utilizado en la medicina tradicional. Se sustenta una línea de investigación para fraccionar los extractos hasta los compuestos activos y comprobar la efectividad antibacteriana.

1. Obee, & Griffith, C. y. (2007). An evaluation of different methods for the recovering of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from environmental surfaces. *Journal of Hospital Infection*, 1 (65), 35-41
2. Copping, L., & Duke. (2007). Natural products that have been used commercially as crop protection agents. 63: 524-554.
3. Fukai, T. M. (2002). Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*, 536-539



Universidad Autónoma de Coahuila
Facultad de Medicina
Unidad Torreón

DE TORREÓN

CONTENIDO

EDITORIAL

ARTÍCULOS ORIGINALES

INTERMITTENT BETA-GLUCAN IN BLOOD CIRCULATION IN TWO GENOTYPES
HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME

NIVELES DE NOH EN MUJERES AUTÓCTONAS QUE VIVEN EN ÁREAS
DE PRODUCCIÓN CONTINUADA A PLUMO EN TORREÓN COAHUILA

EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN
EL NOROESTE DE MÉXICO
DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DOMESTICO

FACTORES DE RIESGO PARA PADecer DIABETES MELLITUS
GESTACIONAL EN PACIENTES DE LA CLÍNICA HOSPITAL ISSSTE
COMITÉ PALACIO GUERRERO

ESTUDIO SANTIAGO EN ALIMENTOS Y AGUAS FRESCAS EX-
PENDIDOS EN LA VÍA PÚBLICA DE LA CIUDAD DE TORREÓN
COAHUILA: CON INDICADORES DE ENFERMEDAD GASTROIN-
TESTINAL BACTERIANA

Association between G-6PT polymorphisms and depression in a Northwest
Mexican population

ARTÍCULO CLÍNICO

ALTERED DEVELOPMENT, CRANIAL Y EMBARAZO A TÉRMINO.

ARTÍCULO DE REVISIÓN

TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTROSIS CON IMPLANTE DE
CELULAS MADRE

LAS PLANTAS MEDICINALES: UNA ALTERNATIVA EN EL TRATA-
MIENTO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

NOTA TÉCNICA

TENDENCIAS ACTUALES DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DEL
PAPLOMA HUMANO ASOCIADO A CÁNCER EN CAVIDAD ORAL

Volumen III, núm. 3, 3ª época

ISSN: 1605-5422

Diciembre 2011

LAS PLANTAS MEDICINALES: UNA ALTERNATIVA EN EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

Vega-Menchaca M.¹, Serrano-Gallardo L.B.^{1,2}, Morán-Martínez J.¹, Hernández-Herrera A.D.², Rivera-Guillén M.A.²

Cultivo de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, ²Departamento de Bioquímica y Farmacología, Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila, ³Laboratorio de Biología Celular y Ultraestructura, Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila.

RESUMEN

Los productos naturales contienen una amplia diversidad de compuestos químicos que poseen el potencial para obtener nuevos antimicrobianos que puedan utilizarse en el tratamiento de bacterias patógenas aisladas en pacientes hospitalizados. La importancia del estudio de las plantas medicinales es evaluar la eficacia como nuevos antimicrobianos haciendo una contribución a su validez científica. Una de las ventajas del empleo de las plantas medicinales es que poseen un amplio rango de actividad microbiana, debido a que contienen una gran cantidad de principios activos que las hacen tóxicas para los microorganismos. En años recientes se ha incrementado el interés en el uso de los productos naturales para el control de microorganismos patógenos del hombre. Por lo tanto es importante considerar el estudio de las especies vegetales como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Palabras clave: productos naturales, bacterias patógenas, antimicrobianos, principios activos

ABSTRACT

Natural products contain a wide variety of chemical compounds, that have the potential for antimicrobial agents that can be used in combating pathogenic bacteria isolated in hospitalized patients. The importance of medicinal plant study is to evaluate the efficacy of new antimicrobial use as making a contribution to scientific and relative validity. One of the advantages of the use of medicinal plants is that they have a wide range of microbial activity, because they contain large amounts of active ingredients that are toxic to microorganisms. In recent years, there has been increased interest in the use of natural extracts for the control of human pathogens, therefore it is important to consider the study of plants as an alternative approach in the treatment of infectious diseases.

Keywords: Natural products, pathogenic bacteria, antimicrobial active

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana ha obligado a la industria farmacéutica y a los investigadores a desarrollar y utilizar nuevos antibióticos, que conforme pasa el tiempo incrementa la dificultad para desarrollarlos, son más costosos y a veces presentan más efectos adversos hacia el organismo humano que los antecesores.

Cuando se tiene un nuevo fármaco, después de pasar por todas las fases de investigación, se especifica el espectro de microorganismos al cual va dirigido y donde será eficaz; sin embargo, conforme se utiliza en la clínica, las bacterias desarrollan resistencia e inclusive puede llegar a quedar en desuso por su falta de eficacia, provocada por la capacidad de las bacterias para desarrollar mecanismos de resistencia que impidan al fármaco inhibirla o destruirla totalmente.

Es por esto, que el uso de los derivados de las plantas como base para la investigación de nuevos agentes antimicrobianos es vital en este tiempo, y gracias al desarrollo de proyectos que buscan alternativas menos dañinas para la salud del paciente, de costo reducido para favorecer la accesibilidad a este, se han descubierto infinidad de compuestos de origen natural para el tratamiento de infecciones bacterianas. Estos compuestos pueden ser utilizados como base para un nuevo medicamento ya que las investigaciones demuestran que existen muchas ventajas al consumir antibióticos de origen natural puesto que existen evidencias de que estos no generan resistencia por las bacterias y puedan ayudar a otros procesos en el organismo.

Durante los pasados 5000 años nuestros antepasados utilizaron los productos naturales como fuente primaria de medicinas, en la actualidad las plantas siguen siendo fuente importante de prototipos de antimicrobianos debido a la gran variedad y complejidad de sus compuestos químicos (Saxena et al., 2006). La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente en aquellas dolencias para las que no existe un remedio adecuado. Si se entiende por "natural" lo que el Diccionario de la Real Academia Española define como aquello "perteneciente o relativo a la naturaleza", la acepción engloba distintos aspectos. Por un lado, deben ser considerados los elementos naturales que forman la base

periódica, y como ejemplo de los utilizados en el tratamiento antimicrobiano se pueden citar el oxígeno, el yodo y el arsénico, empleados para las infecciones por anaerobios, la desinfección y el tratamiento de la sífilis, respectivamente. [Giamarelou H, 2000; Gautier V, 1999; Krause RM, 1991]. Mención especial merece el uso de sustancias producidas por microorganismos con carácter biocida, haciendo especial hincapié en el papel de los probióticos. Otro aspecto importante a señalar son aquellas sustancias sintetizadas por individuos del reino animal que presentan igualmente capacidad antimicrobiana, con especial referencia a los compuestos de origen peptídico. Pero es sin duda el reino vegetal el que ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útiles aplicables a las enfermedades humanas, en concreto a aquellas producidas por microorganismos (Domingo, 2003). México es un país rico en biodiversidad vegetal y con una larga tradición en la herbolaria que se remonta hasta antes de la conquista española, sin embargo poco ha contribuido científicamente en el ámbito internacional. En la literatura científica hay suficiente evidencia de que algunos productos vegetales son capaces de controlar desórdenes infecciosos de etiología bacteriana. Debido a esto, es importante la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica con potencial antimicrobiano en plantas que crecen en nuestro entorno. Para lograrlo, es necesario fomentar la investigación química y farmacológica con abordaje multidisciplinario, cuyos objetivos sean aislar los principales principios activos, identificarlos, determinar su estructura química y encontrar sus posibles aplicaciones [Cowan, 1999]. Muchos descubrimientos importantes se destacan en estos últimos siglos en donde se ven inmiscuidas las plantas. En 1640, se descubre la eficacia de la quina (corteza del quino) en el tratamiento de la malaria. En 1785, el médico mineralógico y botánico, William Withering (1743-1799) introdujo el uso de la digital en la terapéutica, especialmente en las hidropesías. En 1807, Sertürmer aisló el alcaloide morfina del opio crudo. Más tarde, se aislaron otros alcaloides como la atropina (de la belladona) y la emetina (de la raíz de ipecacuana). En 1817, El fisiólogo francés François Magendie (1783-1855), considerado uno de los descubridores de la fisiología celular, aisló otro alcaloide, la estricina de las semillas de nuez vómica. Estas referencias, son sólo una muestra de los destacados e interesantes descubrimientos que señalan el auge de la utilización de las plantas medicinales [Gódia et al., 2007].

Gracias al conocimiento de esta información, hoy en día el uso de la medicina tradicional como base para estudios farmacológicos ha ganado campo en el interés de los científicos para la producción de nuevos fármacos basados en los componentes de las plantas medicinales, y así proveer a la población mundial un medicamento más accesible económicamente y con menos riesgos colaterales. Una definición más amplia y de los doctores Malte Bühring y Pablo Sáiz [1998] define que medicina naturista... "Es la ciencia que aborda la capacidad curativa de nuestro propio

organismo, el uso terapéutico de las sustancias y elementos naturales de nuestro entorno, y la aplicación de los procesos naturales y actividades fisiológicas con fines terapéuticos" (Bühring y Sáiz, 1998).

La medicina tradicional (MT) se ha ido utilizando ampliamente en todas las civilizaciones y es un sistema sanitario que está creciendo rápidamente y de gran importancia económica. En África hasta un 80% de la población utiliza la MT para ayudar a satisfacer sus necesidades sanitarias. En Asia y en Latinoamérica, las poblaciones siguen utilizando la MT como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales. En China la MT contabiliza alrededor de un 40% de la atención sanitaria. Mientras tanto, en muchos países desarrollados, la Medicina tradicional (MT) ha cobrado auge y se está haciendo cada vez más popular. El porcentaje de población que utiliza la MT al menos una vez es de un 48% en Australia, un 70% en Canadá, un 42% en EE UU, un 38% en Bélgica y un 75% en Francia [OMS, 2005].

La Organización Mundial de la Salud ha recomendado validar farmacológicamente las plantas que utilizan los pobladores para tratar sus enfermedades, un alto porcentaje de la población mexicana todavía utiliza la herbolaria para alivio de sus enfermedades. Por este motivo, el estudio de las plantas busca descubrir nuevos agentes antimicrobianos que sean eficaces con menos efectos tóxicos en el organismo humano.

Resistencia bacteriana

Desde el inicio mismo de la era antibiótica (aparición de la penicilina) se ha descrito el fenómeno de la resistencia, se destaca en los años sesenta la aparición de la resistencia a la meticilina y posteriormente diversos mecanismos de resistencia a los betalactámicos (betalactamasas de espectro extendido; neumococo resistente a la penicilina) [Sussmann, 2006] y las primeras señales de alarma se dieron cuando algunos hospitales de todo el mundo anunciaron que la vancomicina, un potente antibiótico, era incapaz de combatir a *Staphylococcus aureus*, la bacteria responsable de muchas infecciones hospitalarias [Cabrera, 2005]. Así mismo, en años recientes reportes científicos han demostrado que el uso de sustancias químicas antimicrobianas utilizadas en áreas hospitalarias, constituyen un factor importante en el desarrollo y selección de cepas antibiótico-resistentes [Gilbert, 2003]. La resistencia a los antimicrobianos se considera un problema de salud pública que se presenta mundialmente. En los últimos sesenta años se ha hecho notorio el impacto de la respuesta de los microorganismos a la presión selectiva que ejercen los antisépticos y biocidas, así como los compuestos quimioterapéuticos utilizados en los brotes de infecciones en los hospitales del mundo. Según estudios epidemiológicos, América Latina se encuentra entre las regiones con más alta incidencia de brotes nosocomiales [Cabrera et al., 2007]. Los problemas de resistencia de los

microorganismos a los antimicrobianos sintéticos y los efectos colaterales que poseen los antibióticos (Rangel et al., 2001) ha generado un particular interés por la búsqueda de plantas con actividad antimicrobiana. Estas aportan gran variedad de compuestos químicos con carácter antimicrobiano, algunos de los cuales muestran una actividad *in vitro* comparable a la de los antimicrobianos sintetizados en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. El arsenal terapéutico de las plantas es incalculable ya que hasta el momento se reconoce solo un porcentaje muy bajo de los compuestos producidos por el reino vegetal. Estas plantas pueden ser utilizadas directamente o como base para la síntesis de nuevos fármacos útiles en el tratamiento de las infecciones (Domingo, 2003).

Importancia de las plantas medicinales

Los pueblos primitivos la gente atribuía el poder curativo de las plantas a la intervención de sus dioses, no se sabe con certeza cómo se empezaron a utilizar pero hay evidencia de que el hombre de Neandertal que vivió hace 60,000 años en el actual Irak, usaba las plantas con fines medicinales (Quintero AA, 2007). Posteriormente a lo largo de la historia han tenido otros ejemplos bien documentados sobre el tema, como son las figuras de Hipócrates en la medicina griega, Aesculapio en la cultura árabe y Paracelso en la cultura europea, que fueron auténticos especialistas en la utilización de las plantas medicinales. En la época contemporánea existe un gran interés en la investigación de nuevas actividades antimicrobianas de plantas y prueba de ello es que diferentes compañías farmacéuticas centran sus esfuerzos en este campo (Domingo D et al., 2003). Las plantas constituyen un valioso recurso en los sistemas de salud de los países en desarrollo y no existen datos precisos que aseguren la extensión del uso global de las plantas medicinales. En México, la medicina tradicional registra una gran importancia en el tratamiento de diversas enfermedades, ya sea por prácticas médicas comunitarias, o por ser motivo de múltiples estudios que conforman la base para la elaboración de medicamentos. En buena medida, a esto contribuye la riqueza de la flora del país (García, 2004). En nuestro país existe una gran diversidad étnica y cultural, lo que ha resultado en un amplio uso de plantas, con cerca de 7000 especies útiles de un total de 22,000 especies de plantas con flores (Martínez, 2006). Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 10 y 5,000 plantas que tienen un potencial terapéutico ético. Un total de 3,000 especies han sido compiladas en un catálogo de plantas medicinales empleados por diversos pueblos étnicos. Incrediblemente, aproximadamente sólo el 10% de las plantas medicinales ha sido estudiado a fondo, ignorando sus propiedades medicinales potenciales. Por tanto, es claro que debe llevarse a cabo mayor investigación clínica y etnobotánica, en virtud de elucidar el beneficio medicinal de varias plantas mexicanas (García, 2003). Son numerosas las investigaciones dedicadas a la búsqueda de nuevos compuestos con

actividad biológica a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un gran número de estudios han sido dirigidos hacia la evaluación de la actividad antimicrobiana en extractos y aceites esenciales, ejemplo de ello son las investigaciones realizadas en extractos de distinta polaridad de *Azadirachta indica* (neem), *Ruta graveolens* (ruda), *Cinnamomum cassia* (canela), *Thymus serpyllum* (tomillo) que mostraron inhibición contra *Escherichia coli*, *Salmonella infantis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Chlibek et al., 2006; Alzoreky et al., 2003; Ojeda et al., 2000). En particular el Norte de México con un clima semiárido, posee un gran número y variedad de plantas que crecen bajo condiciones climáticas extremas (Adame y Adame, 2000). Estudios de investigación con plantas del desierto han demostrado que algunas especies muestran actividad antimicrobiana *in vitro* por lo que es de esperarse que otras plantas del mismo hábitat presenten esta actividad biológica. Estudios farmacológicos en la búsqueda de nuevos medicamentos antituberculosos (anti TB), reportan la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la corteza de raíz de *Leucophyllum frutescens* usando una cepa sensible y una multidrogoresistente (MDR) de *Mycobacterium tuberculosis*, encontrando actividad antituberculosa en ambas cepas (Molina-Salinas et al., 2007). Céspedes y colaboradores (2006), comprobaron que los extractos MeOH/CH₂Cl₂ de *Tagetes lucida* inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* sp. y *Shigella* sp. Molina Salinas (2005) evaluó varias plantas del desierto reportando que los extractos metanólicos, hexánicos y acetónicos de las partes aéreas de *Flourensia cernua* no solo inhibieron el crecimiento sino que también mataron las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y CIBIN-UMF-15-99. La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes anti-infectivos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica (López R, 1997).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial en alguna ocasión ha utilizado la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de productos de plantas o sus principios activos (Bermúdez A et al., 2005; Ojeda T et al., 2000). Los constituyentes de las plantas pueden ser aislados y usados directamente como agentes terapéuticos como materiales de inicio para la síntesis de fármacos o bien, pueden servir como modelos para compuestos farmacológicamente activos en la síntesis de medicamentos (Bermúdez et al., 2005; Sepúlveda et al., 2003). En la actualidad existe una gran variedad de evidencias que indican las propiedades curativas de las plantas y los grandes beneficios que estas traen consigo.

Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (Avalos et al., 2009). Las plantas poseen la capacidad de sintetizar sustancias de distinta naturaleza química los cuales se encuentran integrados intracelular y extracelularmente a las partes del vegetal. Para separar los principios activos de los extractos crudos, se han desarrollado estudios fisicoquímicos. Los extractos vegetales puros son mezclas complejas que pueden estar constituidos por cientos de compuestos fitoquímicos (Bruneton J., 1991). Se han aislado alrededor de 12,000 compuestos procedentes de diversas especies vegetales que constituyen el 10% de los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Korou O et al., 2005). La estructura de los compuestos fitoquímicos con actividad antimicrobiana es diversa y ha sido necesario clasificarlos en los siguientes grupos: fenoles simples y ácidos fenólicos, quinonas, flavonoides, taninos, terpenos, alcaloides, ácidos esenciales, polipéptidos y otros grupos (sin clasificar) (Tabla 1). Los componentes químicos de las plantas son generalmente abundantes y de estructura diversa, según su naturaleza química se pueden clasificar en orgánicos, los cuales están formados por los compuestos procedentes del metabolismo secundario, y los inorgánicos constituidos principalmente por agua y minerales (Kuklinski 2000).

Tabla 1. Compuestos químicos procedentes del metabolismo secundario y mecanismos de toxicidad de versus especies vegetales. (Bruneton J., 1991; Murphy CM, 1999; Kuklinski C, 2000; Iturza G et al., 2007).

Grupo químico	Compuestos	Composición química	Mecanismo de toxicidad microbiana
Fenoles simples	Ácido cinámico y cafeico	anillo fenólico sustituido	Inhibición enzimática por los compuestos oxidados
Quinona	Hypericina	anillo aromático con dos grupos ceto	adhesión, polipéptidos de la pared celular, inhibición enzimática de la membrana celular
Flavona	esculetina, escopuletina	derivados de la flaveno-6-ona	interacción del DNA de la célula microbiana
Alcaloide	quina, quinina	nitrogenados heterocíclicos	interacción del DNA microbiano y la pared celular

des
con el grupo
carbono.
proteína soluble y
PC.

En la Tabla 2 se muestran ejemplos de compuestos fenólicos en diferentes organismos según el Phylum a que pertenecen.

Grupo químico	Planta	Microorganismos
Fenoles simples	<i>Thymus officinalis</i> <i>M. chamomilla</i> <i>Ocimum basilicum</i>	General, <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i>
Quinonas	<i>H. perforatum</i>	Virus del VIH
Taninos	<i>Quercus rubra</i>	Bacterias y virus
Cumarinas	<i>M. chamomilla</i>	Virus
Flavonoides	<i>Camelia sinensis</i>	Shigella
Alcaloides	<i>E. coca</i> <i>Piper nigrum</i>	Cocos Gram (+), Hongos

Tabla 2. Distribución de los principales compuestos fenólicos en el reino vegetal según el Phylum.

Phylum	Principales compuestos
Bacteria	Fenoles derivados de polifenoles y quinonas (ocasionalmente presentes).
Hongos	Fenoles simples, fenilpropanoides y quinonas (regularmente reportadas).
Algas	Fenoles iodados y bromados, derivados del floroglucinol en la pared celular.
Líquenes	Antraquinonas, depéidos, depidonas y xantonas
Bryofitas	Fenoles en la pared celular, fenilpropanoides, estilbenos y algunos flavonoides.

(Harborne, 1990).

Tabla 3. Grupos químicos con actividad antimicrobiana obtenidos de diversas especies vegetales. (Murphy, 1999)

CONCLUSIONES

El estudio de la herbolaria medicinal y su conocimiento ancestral deben ser objeto de curiosidad científica por parte de científicos sociales en colaboración con biólogos, químicos y farmacéuticos a fin de proporcionar formas alternativas de mitigar malestares y de resolver problemas de salud que a todos afligen.

Las plantas medicinales no han perdido su notable preeminencia en el mundo menos desarrollado, hasta el punto de reconocerse como una buena alternativa a los medicamentos convencionales debido a que aportan una

una cantidad de compuestos químicos con carácter antimicrobiano, algunos de los cuales muestran una actividad *in vitro* comparable a la de los antimicrobianos sintetizados en clínica. El arsenal terapéutico del reino vegetal es incalculable, ya que hasta el momento se conoce un porcentaje muy pequeño de los compuestos naturales procedentes de las plantas. Estas sustancias pueden ser utilizadas directamente o como base para la síntesis de nuevos principios útiles en el tratamiento de las infecciones. La medicina, biogeografía, etnogeografía, etnobotánica, fitofarmacología, economía global, desarrollo local, etc., el conocimiento de ciencias interesadas por el alcance de las plantas medicinales obliga a trabajos multidisciplinarios, hilvanados por la prudencia de la óptica limitada que tiene cada área de conocimiento y sobre todo orientados a la persona, el terapeuta y particularmente siempre será sanar o aliviar la dolencia de una persona singular.

Ante cada padecimiento crece una planta
aracelso, siglo XVI

Referencias

- Adame J., Adame H. (2000). Plantas curativas del Noroeste Mexicano. México, Editorial Castillo.
- Azoreky N.S., Nakahara K. (2003). "Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia." *Int. J. Food Microbiol* 80(3): 223-230.
- Ávalos García, A., y Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. REDUCA. Serie fisiología vegetal.
- Barquero, A. A. (2007). Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Revista Química viva* 6(2): 19-35.
- Bermúdez, A., Oliveira Miranda, M. A., y Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interiencia*, 30(8): 453-459.
- Bruneton J. (1991). Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Zaragoza, España. Ed. Acribia.
- Bohring, M., & Sz, P. (1998). Introducción a la Medicina Naturalista. Ediciones Paidós Ibérica.
- Cabrera Cao, J., Fadrags Fernández, A., y Guerrero Guerrero, L. G. (2005). Antibióticos naturales. Mito o realidad. *Rev Cubana Med Gen Integral*, 21(3-4).
- Céspedes, C., Ávila, J.G., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Mugica, J.C., Salgado-García, R. (2006). Antifungal and antibacterial activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *J Agric Food Chem* 54(10): 3521-3527.
- Chlibek R., Hartmanova M., y col. (2006). "The Use of Foam Substances for Disinfection." *Indoor and Built Environment* 15(1): 77-79.
- Cowan ST., S. KL. (1993). Manual for the Identification of Medical Bacteria. London, England, Cambridge University Press.
- Domingo D., López-Brea M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Especializada Quimioterapia*, S. E. D. Quimioterapia. Madrid, Hospital Universitario de la Princesa: 385-393. Editorial Acribia S.A.
- Gatuso G., Barreca D. (2007). *Flavonoid Composition of Citrus Juices Molecules*. Messina, Italia, Dipartimento di Chimica Organica e Biologica, Università di Messina, Salita Sperone 1641-1673.
- Gautier, V. 1999. Hygiene and disinfection best practises for home assisted respiratory care. *Rev Mal Respir* 16: 141-142.
- Giamarelou, H. 2000. Anaerobic infection therapy. *Int J Antimicrob Agents* 16: 341-346.
- Gódia Ribes, J. (2007). La farmacología y su florecimiento en las edades históricas, los orígenes y las fuentes de los fármacos. XIV Congreso Nacional y I Iberoamericano de Historia de la Veterinaria.
- Gonzalez Stuart, A. (2003). Plantas medicinales. Ediciones Castillo, 30(6), 215-219.
- Harborne, J.B., (1997). Recent advances in chemical ecology. *Natural Product Reports* 14, 83-97.
- Karou D., Dicko M.H. (2005). "Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso." *African Journal of Biotechnology* 4(8): 823-828.
- Krause, R.M. (1991). Syphilis during. Similarities to present-day AIDS. *Allergy Proc* 12: 127-132.
- Kuklinski C. (2000). Farmacognosia. España, Ediciones Omega.
- Lagarto P.A., Silva Y.R., (2001). "Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts." *Phytomedicine* 8(5): 395-400.
- López P.Y., Angulo E.M. (2007). "Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y xenadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22." *Bioquímica* 32(4): 117-125.
- Martínez Moreno, D., Aharado Flores, R., Mendoza Cruz, M., y Basurto Peña, F. (2006). Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México. *Boletín Sociedad Botánica de México*.
- Molina Salinas G.M., Ramos Guerra MC, Mata Cárdenas BD, Becerril Montes P, Said Fernández S. (2005). Bactericidal Activity of Organic Extracts from *Flourensia cernua* DC against Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Medical Research* 45-49.
- Molina-Salinas G.M., Pérez López A, Becerril-Montes P, Salazar-Aranda R, Said-Fernández S, Waksman de Torres N. (2007). Evaluation of the flora of Northern Mexico for *in vitro* antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology* 109 (2007) 435-441.
- Murphy C.M. (1999). "Plant Products as Antimicrobial Agents". *Clinical Microbiology Review* 12(4): 564-582.